

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



**VLIV ANALOG GLP-1 (GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1)
NA HEPATOCYTY POTAKANA V PODMÍNKÁCH *IN VITRO***

The effect of GLP-1 (glucagon-like peptide-1) analogues
on rat hepatocytes *in vitro*

(Diplomová práce)

Školitel: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.

Konzultant: MUDr. Otto Kučera, PhD.

Bc. Veronika Krejčíková

Hradec Králové 2014

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Předně bych ráda poděkovala MUDr. Ottovi Kučerovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a inspirativní spolupráci a také ostatním zaměstnancům Ústavu fyziologie LFHK za jejich pomoc, vstřícnost, příjemné prostředí a vůbec možnost zpracování této DP na jejich pracovišti.

Dále velmi děkuji za ochotu a trpělivost doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD., bez jehož spolupráce bych práci nemohla začít, natož odevzdat.

Rovněž bych chtěla poděkovat programu PRVOUK P37/02 za finanční podporu. A nakonec nemohu s díkem opomenout všechny rodinné příslušníky, přátele a známé, kteří mě jakýmkoliv způsobem podporovali.

Abstrakt

Bc. Veronika Krejčíková

Vliv analog GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) na hepatocyty potkana v podmínkách *in vitro*.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Měřením vybraných parametrů jsme sledovali vliv liraglutidu (LIRA; analoga GLP-1) na nesteatotické (ST-1) a steatotické (HF) hepatocyty potkana v podmínkách *in vitro*. Dále jsme sledovali jeho případný hepatoprotektivní účinek na buňky poškozené acetaminofenem (APAP).

Metody: Jako model pro pokusy jsme využili primární kultury nesteatotických a ztukovatělých hepatocytů potkana izolované z jater samců potkanů kmene Wistar. Steatóza u nich byla navozena podáváním vysokotukové diety (71% energie z tuků) po dobu 6 týdnů. Jako kontroly sloužily potkani krmení standardní dietou (10 % energie z tuků). Hepatocyty byly izolovány dvoustupňovou kolagenázovou perfuzí. Na připravených primárních kulturách jsme testovali vliv LIRA o koncentracích 1, 10 a 100 nmol/l na intaktní, nesteatotické a steatotické, hepatocyty a dále na hepatocyty po působení APAP o koncentracích 2,5; 3,75 a 5 mmol/l. Po 24 resp. 20 hod. inkubaci jsme zjišťovali aktivitu laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu, viabilitu hepatocytů, produkci albuminu, koncentraci malondialdehydu (MDA) a produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Morfologické hodnocení buněk bylo provedeno pomocí fázové mikroskopie.

Výsledky: Použité koncentrace LIRA nevedly ke statisticky významné změně aktivity LDH, neměly vliv na viabilitu buněk, ani na produkci albuminu, MDA a ROS oproti příslušným kontrolám ani v jedné skupině hepatocytů. Výsledky měření nenaznačovaly, že by LIRA ovlivňoval primární kultury intaktních ST-1 a HF hepatocytů, ani hepatocyty s indukovaným poškozením APAP.

Závěr: LIRA o použitých koncentracích 1, 10 a 100 nmol/l po 24 resp. 20 hod. působení nemá prokazatelný vliv na měřené biochemické parametry v intaktních, nesteatotických ani steatotických hepatocytech. Rovněž nevykazuje hepatoprotektivní vliv na poškození hepatocytů indukované acetaminofenem.

Abstract

Bc. Veronika Krejčíková

The effect of GLP-1 (glucagon-like peptide-1) analogues on rat hepatocytes *in vitro*.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Specialist in Laboratory Methods

Background: We observed the effect of liraglutide (LIRA; a GLP-1 analogue) on rat non-steatotic (ST-1) and steatotic (HF) rat hepatocytes *in vitro*. We also monitored its potential hepatoprotective effect on the cells damaged by acetaminophen (APAP).

Methods: As a model for our experiments we used the primary cultures of rat hepatocytes isolated from the liver of male Wistar rats. For isolation of lean and fatty hepatocytes, we used rats fed by standard laboratory diet (10% energy from fat) and high fat diet (71% energy from fat) for 6 weeks. Hepatocytes were isolated by two-step collagenase perfusion. We used LIRA at concentrations of 1, 10 and 100 nmol/l on intact, ST-1 and HF hepatocytes; we also tested effect of LIRA on hepatocytes after exposure to 2.5; 3.75 and 5 mM APAP. After 24/20-hours incubation, we tested the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in culture medium, the viability of hepatocytes, production of albumin, and level of MDA and ROS production. Morphological evaluation of cells was performed by using phase microscopy.

Results: LIRA at tested concentrations did not lead to statistically significant change of LDH activity, had no effect on viability of the cells, or production of albumin, MDA and ROS, when compared to the appropriate controls in either group of hepatocytes. Results of our measurements did not suggest that LIRA have affected primary cultures of intact ST-1 and HF hepatocytes. Also we did not register any changes of cellular morphology or changes of biochemical parameters in hepatocytes, which were cocultivated with APAP and LIRA.

Conclusion: LIRA at tested concentration did not show any beneficial effect after 24/20-hours incubation on biochemical parameters in intact, ST-1 or HF hepatocytes. We also did not observe any protective effect on hepatocyte injury induced by APAP.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 JÁTRA.....	10
2.1.1 MORFOLOGIE JATER	10
2.1.1.1 ANATOMIE	10
2.1.1.2 HISTOLOGIE JATER.....	12
2.1.2 FYZIOLOGIE JATER.....	16
2.1.2.1 METABOLIZMUS CUKRŮ.....	17
2.1.2.2 METABOLIZMUS TUKŮ.....	17
2.1.2.3 METABOLIZMUS AMINOKYSELIN	18
2.1.2.4 SYNTÉZA HORMONŮ A PLAZMATICKÝCH PROTEINŮ	18
2.1.2.5 DETOXIKAČNÍ FUNKCE	18
2.1.2.6 INAKTIVACE HORMONŮ, DEGRADACE CHOLESTEROLU.....	19
2.1.2.7 SEKRECE ŽLUČI.....	19
2.1.2.8 ZÁSOBNÍ FUNKCE, ORGÁN KRVETVORBY	19
3 NAFLD, NASH.....	20
3.1 DEFINICE, DIAGNOSTIKA	20
3.2 ETIOPATOFYZIOLOGIE.....	20
3.3 FARMAKOLOGICKÁ TERAPIE.....	24
3.4 ACETAMINOFEN.....	25
4 ANALOGA GLP-1.....	26
4.1 INKRETINY	26
4.1.1 GLP-1.....	28
4.1.2 VLASTNÍ ANALOGA GLP-1	32
4.1.2.1 LIRAGLUTID	33
DM 2. typu a liraglutid	36
5 ZVÍŘECÍ MODEL Y A MODEL Y IN VITRO.....	38
5.1 POTKANI S INDUKOVANÝM NEALKOHOLOVÝM ZTUKOVATĚNÍM JATER.....	38

5.2	SYSTÉMY HEPATOCYTŮ IN VITRO	39
5.2.1.1	PRIMÁRNÍ KULTURY HEPATOCYTŮ.....	41
6	CÍL PRÁCE.....	43
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
7.1	Pokusná zvířata.....	44
7.2	Složení roztoků.....	44
7.3	Dvoustupňová kolagenázová perfuze jater.....	45
7.4	Stanovení viability izolovaných hepatocytů.....	46
7.5	Stanovení denzity buněk.....	46
7.6	Morfologické hodnocení buněk.....	47
7.7	Primární kultury hepatocytů potkana	48
7.8	Liraglutid – design experimentu.....	49
7.8.1	Statistické vyhodnocení	49
7.9	Biochemické testy.....	49
7.9.1	Stanovení LDH	49
7.9.2	WST-1 test	50
7.9.3	Stanovení albuminu	51
7.9.4	Stanovení MDA	52
7.9.5	DCFDA test	53
8	VÝSLEDKY	55
8.1	Výsledky biochemických pokusů.....	55
8.1.1	Vliv LIRA na aktivitu LDH v kultivačním médiu hepatocytů potkana ...	55
8.1.2	Vliv LIRA na viabilitu hepatocytů (WST-1 test)	57
8.1.3	Vliv LIRA na syntézu albuminu v hepatocytech.....	58
8.1.4	Vliv LIRA na produkci MDA v hepatocytech potkana.....	59
8.1.5	Vliv LIRA na produkci ROS (DCFDA test)	60
8.1.6	Vliv LIRA na viabilitu hepatocytů poškozených APAP	61
8.1.7	Vliv LIRA na produkci ROS v hepatocytech inkubovaných s APAP.....	62
8.2	Výsledky morfologického hodnocení	63
9	DISKUZE.....	69
10	ZÁVĚR.....	74

11	SEZNAM ZKRATEK.....	75
12	SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	78

1 ÚVOD

Hepatocyty – snad nejvšestrannější buňky lidského těla - tvoří hlavní podíl celkové hmotnosti jater, metabolického centra organismu s nepřeberným množstvím a širokou paletou různých funkcí

Není překvapením, že jako křižovatka mnoha biochemických a fyziologických pochodů, místo syntézy a degradace různých hormonů a signálních molekul, se játra často přímo či nepřímo podílejí na vzniku či progresi i mnoha pochodů patofyziologických. Ač játra disponují vysokou regenerační schopností, mohou být poškozena mnoha toxickými vlivy, dlouhodobou nerovnováhou v energetickém metabolismu nebo mohou být postižena v rámci patogeneze jiného onemocnění. Prostou jaterní steatózou, jež vzniká důsledkem dysbalance metabolismu lipidů, „trpí“ hlavně ve vyspělých zemích desítky miliónů lidí, aniž by cokoliv tušili. I když jde o onemocnění po dlouhou dobu klinicky prakticky němé, nelze ho označit z hlediska vážnosti za zanedbatelné. Společně s vyšší mírou oxidačního stresu v buňce vede přes poruchy různých signalizačních drah k dalším onemocněním. Jakou roli v prudkém nárůstu těchto nemocí u lidí hraje stres obecně, není předmětem této práce. Je ovšem na místě zmínit, že NAFLD, jako dlouho opomíjená složka tzv. metabolického syndromu, společně s inzulinovou rezistencí a diabetem mellitus typu 2 a hypertenzí jsou závislé nejen na věku a genetických faktorech, ale především na životním stylu. Nejen léčba, ale i prevence těchto patologií, by měla být v zájmu jedince i celé společnosti.

Analoga GLP-1 jsou látky s vysokým potenciálem pro léčbu nejen diabetu druhého typu, pro kterou jsou registrovány, ale vykazují pozitivní účinky i na neurodegenerativní pochody nebo kardiovaskulární systém. Jejich neoddiskutovatelnou výhodou je, že snižují tělesnou hmotnost. Obezita je jedním z rizikových součástí metabolického syndromu a nepříznivě ovlivňuje i jeho součásti další, protože jednotlivé složky syndromu jsou velmi těsně svázány.

Pomocí vhodně vybraných laboratorních zvířat a využití vhodného modelu *in vitro*, jakým primární hepatocyty potkana jsou, je možné mnoho z těchto účinků prozkoumat, a to daleko snáz, než kdybychom se měli spoléhat jen na klinické studie již léčených pacientů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 JÁTRA

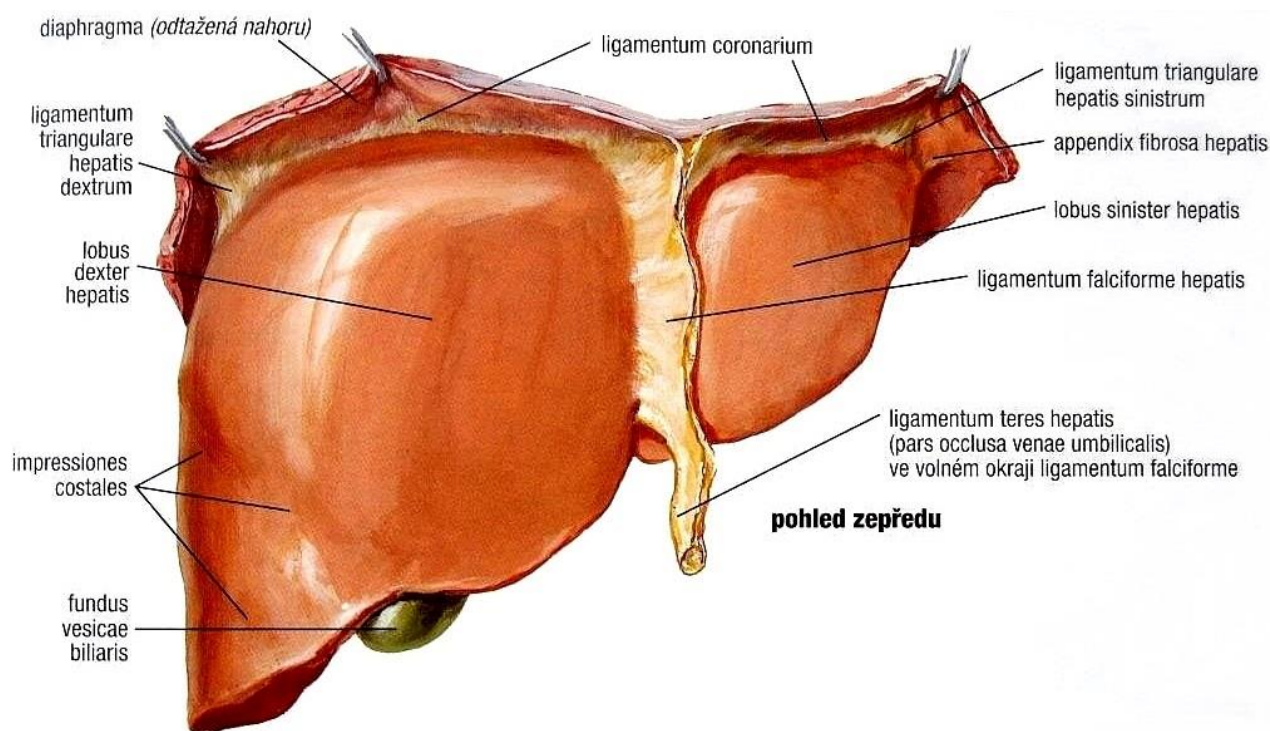
Játra jsou hlavním bioenergetickým centrem těla. Jsou největším, životně nezbytným, vnitřním orgánem. Tvoří křížovátku mnoha metabolických pochodů.

2.1.1 MORFOLOGIE JATER

2.1.1.1 ANATOMIE

Játra se svou průměrnou hmotností 1,5 kg představují největší žlázu v těle. Mají hnědavou barvu, na pohmat jsou měkká a poddajná, avšak relativně křehká, takže poměrně snadno dochází k jejich poranění při nárazech. Chrání je hrudní koš a jsou uložena pod bránicí, kde vyplňují větší část epigastria a pravého hypochondria a vybíhají do oblasti levého hypochondria zhruba k hranici medioklavikulární čáry [1, 3]. S přední stěnou břišní je spojuje *ligamentum falciforme* (obr. 1).

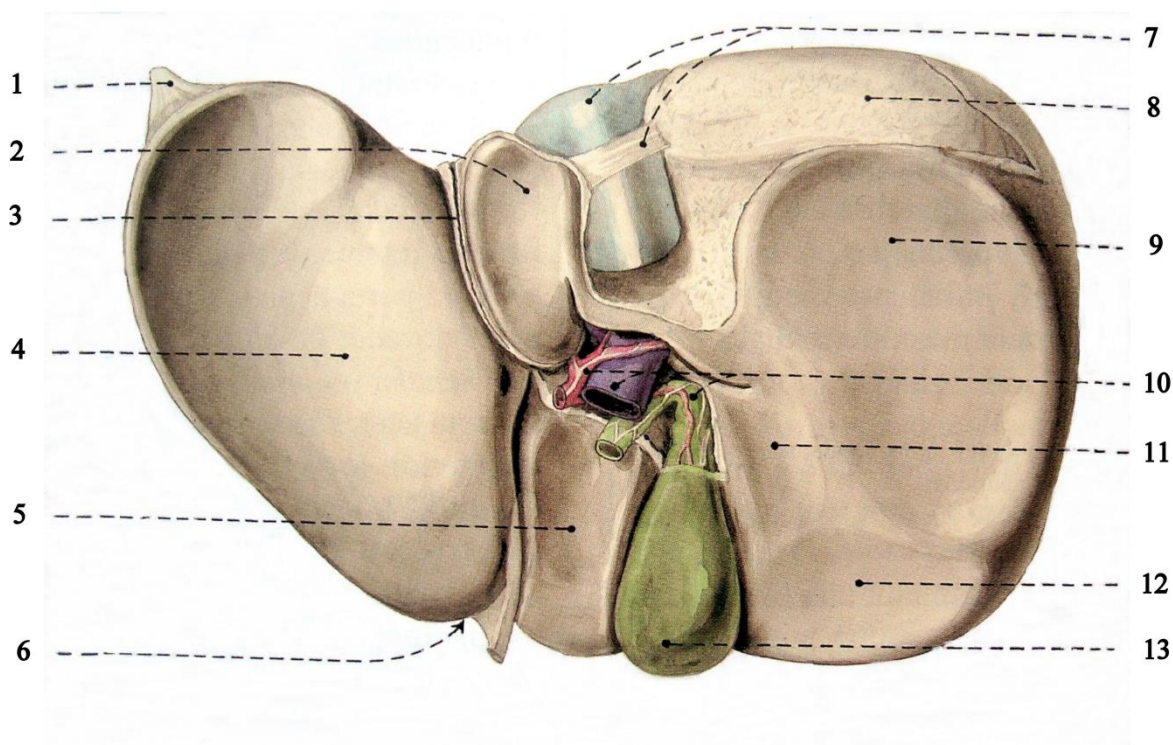
Obr. 1: Pohled na přední plochu jater [2, tabule 287]



Většinu jaterního povrchu (kromě tzv. *area nuda*) kryje vrstva orgánové pobřišnice, částečně jsou pokryta pouzdrem zvaném *capsula Glissoni* [4]. Játra jsou tvořena čtyřmi laloky – *lobus dexter* (největší), *sinister*, *caudatus*, *quadratus*.

Rozlišujeme na nich dvě plochy: brániční (diafragmatickou) a orgánovou (viscerální). Na viscerální ploše jater jaterní brankou (*porta hepatis*) - (obr. 2) vstupují *a. hepatica propria*, *v. portae*, vystupují *ductus hepaticus dexter et sinister* (případně již *ductus hepaticus communis*) a lymfatické cévy. Inervace je zajištěna pomocí autonomních nervů přicházejících k játrům z nervové pleteně (*plexus coeliacus*) a obsahujících sympatická a parasympatická (vagová) nervová vlákna. Krev z jater je odváděna pomocí jaterních žil - *vv. hepaticae*, které jsou zpravidla 3 (2 z pravého, 1 z levého laloku) a ústí přímo do dolní duté žíly v místě jejího vtisknutí do jater v *sulcus venae cavae*. Na játrech se mohou nacházet i otisky ostatních sousedních orgánů – jícnu, žaludku, pravé ledviny a nadledviny, horní části dvanáctníku a pravého ohybu tračníku. [1, 3]

Obr. 2: Pohled na viscerální plochu jater [1, str. 130]



1 – lig. triangulare, 2 – lobus caudatus, 3 – lig. venosum, 4 – impressio gastrica,
5 – lobus quadratus, 6 – lig. teres hepatis, 7 – v. cava inf. s lig. venae cavae, 8 – area
nuda, 9 – impressio renalis, 10 – útvary porta hepatis, 11 – impressio duodenalis,
12 – impressio colica, 13 – vesica fellea

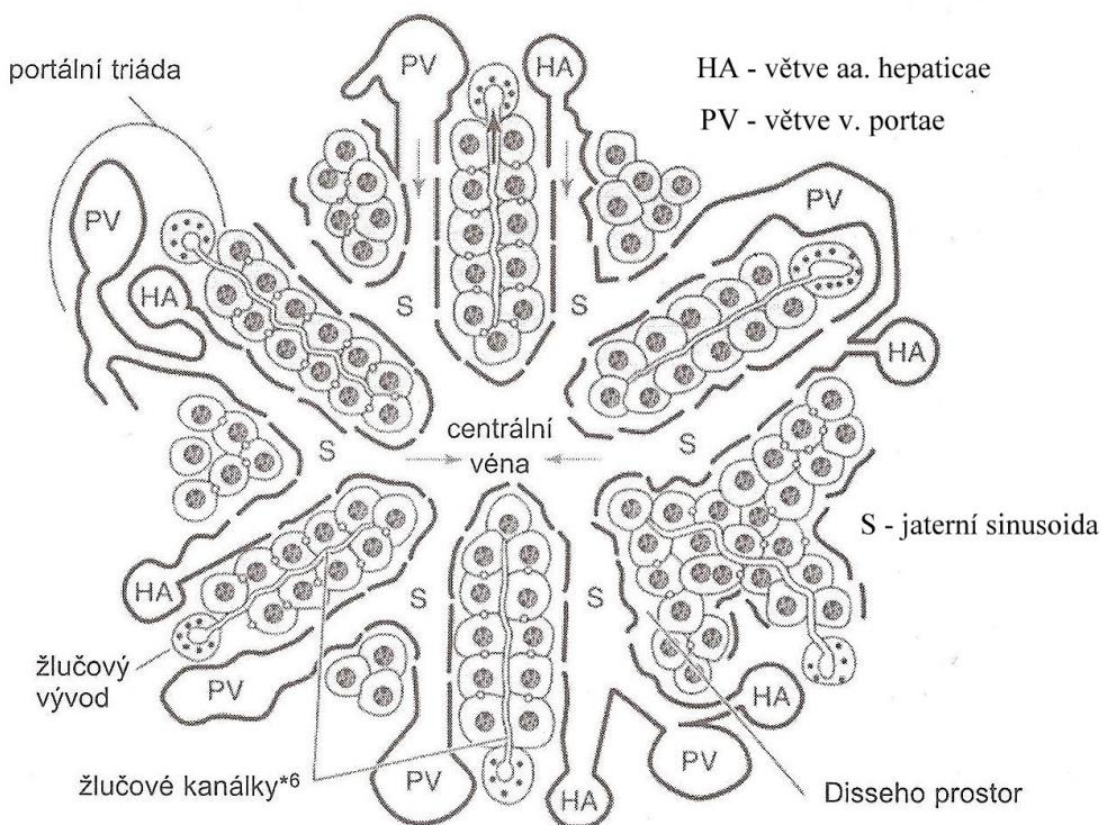
2.1.1.2 HISTOLOGIE JATER

Jaterní parenchym tvoří hepatocyty, buňky polyedrického tvaru, které jsou uspořádány do navzájem anastomozujících trámců, tvořených jednou nebo dvěma vrstvami buněk. Mezi trámci jsou jaterní sinusoidy (viz dále krevní zásobení) vystlané, díky početným otvorům, vysoce permeabilním endotelem [5].

Uvnitř sinusoid se nacházejí hvězdčité Kupfferovy buňky, což jsou jaterní makrofágy likvidující bakterie a jiné cizorodé částice obsažené v protékající krvi; stejně jako makrofágy v kostní dřeni a slezině se podílejí na vychytávání starých krevních buněk, odbourávání hemoglobinu a sekreci proteinů spřažených s imunitními ději. Spolu s endotelovými, Itovými a Pit buňkami patří mezi zástupce neparenchymatózních jaterních buněk. Pit buňky jsou velké granulární lymfocyty patřící do tzv. natural killers, přirozených zabíječů – cytotoxických buněk, které jsou důležitou součástí protivirové a protinádorové ochrany organismu. Itovy buňky se vyznačují dlouhými výběžky; skladují tuky a vitamin A. Produkují řadu mediátorů (růstové faktory, interleukin 6 a další), které podporují regeneraci hepatocytů. Za některých patologických stavů se tyto elementy mohou transformovat v myofibroblasty s následnou produkcí kolagenu (hlavně typ I) a složek extracelulární matrix, což vede k rozvoji jaterní fibrózy vyúsťující v pokročilém stadiu až v jaterní cirhózu. [6]

Játra se skládají z více než milionu jaterních lalůček velikosti o 0,7-2 mm [3, 8]. Každý lalůček, tzv. lalůček centrální vény (*lobulus venae centralis*), má tvar šestibokého hranolu a je základní morfologickou jednotkou jaterního parenchymu (obr. 3, 4). Je tvořen trámci hepatocytů, které se paprskovitě rozbíhají od centrální žíly. U člověka nejsou lalůčky zřetelné jako je tomu např. u prasete, jejich pozice se dá vymezit podle polohy jaterních triád (viz dále) na periferii lalůčku a centrální vény v jeho středu. Mezi stěnou sinusoid a trámci jaterních buněk jsou štěrbinovité perisinusoidální (Disseho) prostory se zastoupením retikulárních vláken a výskytem výše zmiňovaných Itových buněk. [4, 5]

Obr. 3: Schéma lalůčku centrální vény [3, str. 245]



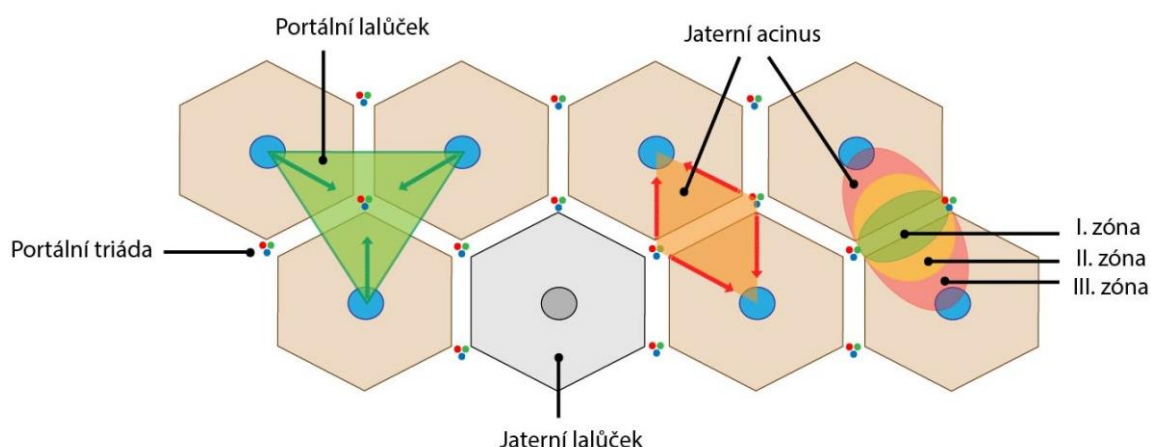
Vlastní hepatocyty měří přibližně 20-30 μm [7], mají kulovité jádro, často jde o buňky dvoujaderné. Cytoplazma je eozinofilní s četnými inkluzemi, např. granuly glykogenu, lipidovými kapénkami a vzácněji i akumulovanými proteiny. Obsahují velké množství organel. V granulárním endoplazmatickém retikulu se tvoří krevní bílkoviny, dobře vyvinuté hladké endoplazmatické retikulum napomáhá při tvorbě žlučových solí a má hlavní podíl na detoxikaci škodlivých látek exogenního i endogenního původu. Je zodpovědné za oxidační, metylační a konjugační pochody. Jiné druhy škodlivin (např. alkohol) detoxikují peroxisomy. V rozsáhlém Golgiho aparátu jsou skladovány nadbytečné produkty endoplazmatického retikula, tvoří se v nich lyzozomy, produkují glykoproteiny (např. transferin) a lipoproteiny plazmy. Hepatocytární lyzozomy hrají důležitou roli v obměně a degradaci buněčných organel i v endocytóze řady makromolekulárních ligandů.

Kvůli vysoké energetické náročnosti jaterních pochodů je přítomno velké množství mitochondrií. Dále hepatocyty obsahují glykosomy - organely, které jsou zásobárnou cukru a jsou nezbytné pro regulaci glykémie.

V místě styku hepatocytů vzniká žlučová kapilára, počáteční část vývodného systému žlučovodů. V okolí žlučových kapilár jsou hepatocyty těsně stmeleny prostřednictvím těsných spojení (*zonulae occludentes*). Pro koordinaci fyziologické aktivity hraje významnou roli velký počet nexů. Na obvodu lalůčku žluč vstupuje do intralobulárních žlučovodů, tzv. Heringových kanálků, které jsou vystlány kubickým epitelem, a následně do žlučovodů portálních triád. Žlučovody postupně sílí a splývají v pravý a levý *ductus hepaticus*.

V každém z rohů lalůčku centrální vény se nachází portobiliární prostor (obr. 5). Je to místo styku více lalůčků, ve kterém najdeme portální triádu (*trias hepatica*): *v. interlobularis* (portální venula, větev *v. portae*), *a. interlobularis* (jaterní arteriola, větev *arteriae hepaticae*) a *ductus bilifer interlobularis* (malý žlučový tubulus, přítok žlučového vývodu). Součástí triády jsou společně s lymfatickými cévami umístěny ve vazivu.

Obr. 4: Schématické znázornění klasického, portálního lalůčku a jaterního acinu

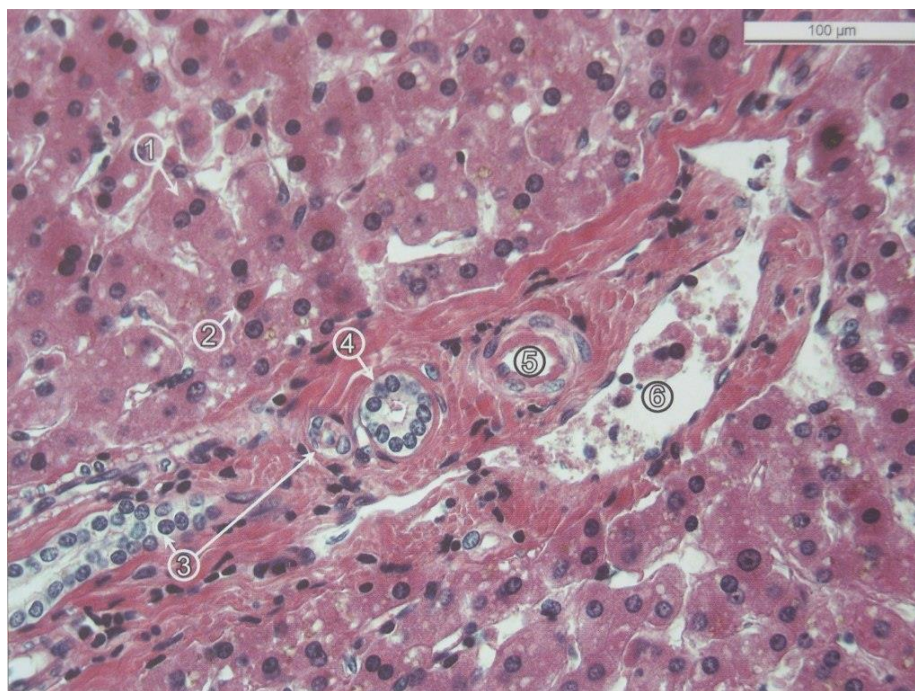


(dostupné z <http://fb.lt.cz/wp-content/uploads/2013/12/jaterni-acinus-a-portalni-lalucek-CZ-01.jpg>, 25. 4. 2014)

Játra mají dvojitý zásobení krví – funkční (asi 75% podíl na celkovém oběhu krve játry) a nutritivní (asi 25%). Funkční složku zajišťuje *v. portae*; přivádí krev ze všech nepárových orgánů dutiny břišní (tzn. ze stěn žaludku, ze střeva, sleziny a slinivky břišní). *V. portae* tedy vzniká z kapilárních sítí uložených v orgánech a po příchodu do jater se větví znovu do kapilárního systému – mluvíme o portálním oběhu, „speciálním“ uspořádání cévního řečiště, které se dále v lidském těle nachází ještě v hypofýze a v ledvinách.

Nutritivní složku představuje *a. hepatica propria*, větev *a. hepatica communis*. Ve vztahu k velikosti a funkčnímu vytížení jater je poměrně tenká a na zásobení hepatocytů kyslíkem se vzhledem dobrému přívodu kyslíku z *v. portae* funkčního oběhu podílí relativně málo. Mimoto slouží k výživě žlučových cest, stěn velkých žil a vaziva. *V. portae* i *a. hepatica propria* vstupují do jater v *porta hepatis*, dále se větví společně ve *vv. a aa. interlobulares*, které spolu s interlobulárním žlučovodem běží v každém portobiliárním prostoru. Z těchto prostor vysílají tři větve k sousedním lalůčkům, tzv. *vv. et aa. circumlobulares*, distribuční cévy, ze kterých odstupují venuly a arterioly do lalůček mezi trámce a vstupují do sinusoid. Jaterní sinusoidy tak obsahují směs žilní a tepenné krve. Látky obsažené v krvi se přímo stýkají s povrchem hepatocytů, který je směrem do Disseho prostoru (viz. obr. 3) bohatě členěn mikrokly. Tímto způsobem se maximalizuje velikost styčné plochy s plazmou omývající jaterní buňky. V Disseho prostoru se setkávají živiny, kyslík a toxiny a uvolněné endokrinní sekrety. Tekutina z Disseho prostoru poté odtéká směrem k lymfatickým cévám (opačný směr než směr toku krve), tzn., že tyto prostory fungují v játrech jako lymfatické kapiláry. Ze sinusoid krev dále putuje do *v. centralis*, která již patří k odtokové části cévního oběhu jater. *Vv. centrales* se spojují do *vv. sublobulares*, ty obvykle do třech *vv. hepaticae*, které ústí do *vena cava inferior*. [1, 7]

Obr. 5: Mikroskopický snímek portobiliárního prostoru [5, str. 48]



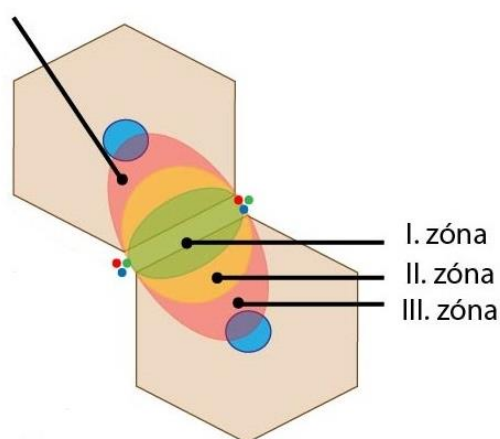
1 – doujaderný hepatocyt, 2- Kupfferova buňka, 3- Heringův kanálek, 4- interlobulární žlučovod, 5 - *a. interlobularis*, 6 - *v. interlobularis*

2.1.2 FYZIOLOGIE JATER

Játra mají stovky různých funkcí. Jsou nezastupitelným orgánem v udržování homeostázy; hlavním centrem mnoha metabolických pochodů a tvoří určitý mezistupeň mezi trávicím systémem a zbytkem organismu. Upravují vstřebané látky, které se vrátnicovým oběhem dostávají do jater. Eliminují látky, které by mohly organismus ohrozit – včetně léků a karcinogenů. Jsou také místem syntézy řady látek. Některé látky ukládají do zásoby. [9] Podílejí se též na vylučování látek prostřednictvím žluči a termoregulaci. Hepatocyt je zřejmě nejvšestrannější buňkou lidského těla.

Funkční jednotkou jaterního parenchymu je jaterní acinus (obr. 4, 6). Jde o pomyslný úsek jater vymezený dvěma trojúhelníky s vrcholem ve *v. centralis* dvou sousedních lalůčků centrální vény, jejichž základny se dotýkají. Zásobený je terminálními větvemi *v. portae* a *aa. hepaticae*.

Obr. 6: Schéma jaterního acinu



(dostupné z <http://fbt.cz/wp-content/uploads/2013/12/Acinus-zony1.jpg>, 25. 4. 2014)

Podle přísunu arteriální krve lze v každém z trojúhelníků v acinu v jaterních lalůčkách vymežit 3 zóny (obr. 6): vnitřní (I), střední (II) a vnější (III). Vnitřní – první - zóna je hojně zásobená kyslíkem, převládají v ní oxidativní procesy (proteosyntéza, glukoneogeneze a uvolňování glukózy do krve, β -oxidace mastných kyselin, katabolismus aminokyselin, tvorba močoviny, tvorba žluči a cholesterolu). Ve vnější – třetí - zóně s nižším zásobením kyslíkem dominují redukční pochody (detoxikace). Střední – druhá - zóna leží na pomezí mezi nimi, probíhají v ní reakce oxidační i redukční. Hepatocyty vnější zóny jsou zodpovědné za vychytávání glukózy z krve, glykolýzu, syntézu glykogenu, lipogenezi a ketogenezi. Odlišnosti v jednotlivých

oblastí acinu jsou příčinou rozdílného stupně poškození při toxickém nebo anoxickém postižení jater. Hepatocyty v blízkosti periportálních polí jsou dostatečně zásobeny kyslíkem, vykazují vysokou aktivitu aminotransferáz: ALT (alaninaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza), dále LDH (laktátdehydrogenáza), GMT (γ -glutamyltransferáza) a ALP (alkalická fosfatáza). Naproti tomu buňky centrolobulární – vnější – zóny jsou zásobeny kyslíkem hůře, mají vysokou aktivitu glutamátdehydrogenázy. Při hypoxii jsou postiženy první. [10, 6]

2.1.2.1 METABOLIZMUS CUKRŮ

Jejich primární úlohou jater v metabolismu cukrů je udržet stálou hladinu glykózy v krvi – tzv. glukostatická funkce. V anabolické fázi metabolismu vychytávají glukózu z portální krve a tvoří glykogen, nebo ji přeměňují na lipidy. V katabolické fázi naopak nastupuje glykogenolýza a glukoneogeneze. V hepatocytech probíhá mnoho cyklů, do kterých jsou cukry zapojeny, např. pentózový (k výrobě NADPH a pentóz), Coriho (k oxidaci laktátu vzniklého ve svalu zpět na pyruvát) nebo alaninový (k vzájemné přeměně alaninu a pyruvátu ve svalu a játrech sloužící k odstranění amoniaku vzniklého ve svalech). Játra obsahují specifické enzymy metabolismu cukrů: glukokinázu, fruktokinázu a galaktokinázu. Glukóza je přes cytoplazmatickou membránu hepatocytů transportována usnadněnou difuzí pomocí GLUT 2 přenašeče [12]. Metabolismus sacharidů je v játrech regulován pomocí hormonů a přítomné koncentrace substrátů. Kromě toho se uplatňuje i regulace nervová. Syntéza glykogenu je podporována vzestupem koncentrace glukózy v portální krvi spolu s inzulinem. Stimulační účinky má i aktivace parasympatického nervového systému. Glukagonem a katecholaminy naopak podporují glykogenolýzu. [11, 13]

2.1.2.2 METABOLIZMUS TUKŮ

Z metabolismu tuků probíhají v játrech tyto: syntéza, β -oxidace (při níž vzniká acetyl CoA) a peroxidace mastných kyselin, syntéza triacylglycerolů, fosfolipidů a cholesterolu. Jaterní buňky tvoří lipoproteiny a zpracovávají chylomikrony, které přišly do jater portálním oběhem ze střeva. Také zde za určitých podmínek probíhá lipogeneze a ketogeneze.

2.1.2.3 METABOLIZMUS AMINOKYSELIN

Játra pomáhají udržovat stálou hladinu aminokyselin v plazmě. Vychytávají glukogenní aminokyseliny jako je alanin, serin a treonin, syntetizují neesenciální aminokyseliny a katabolizují většinu esenciálních aminokyselin (kromě těch s rozvětveným řetězcem – valinu, leucinu a isoleucinu). Jako odpověď na snížení plazmatické koncentrace aminokyselin je uvolňován glukagon, který v játrech proteolýzu stimuluje, naopak vzestup hormonu inzulinu a aminokyselin proteolýzu tlumí. Deaminace aminokyselin je začátkem cyklu tvorby močoviny, což je odpadní látka metabolismu bílkovin. [13]

2.1.2.4 SYNTÉZA HORMONŮ A PLAZMATICKÝCH PROTEINŮ

V hepatocytech se tvoří většina plazmatických proteinů (s výjimkou imunoglobulinů a vWF) a všechny (kromě C-reaktivního proteinu a albuminu) patří mezi glykoproteiny. Za 24 hod. se jich v játrech vytvoří asi 50g. Na rozdíl od jiných žlázových buněk je hepatocyty neskladují v cytoplazmě ve formě sekrečních granulí, ale plynule je uvolňují exocytózou do krevního oběhu. Jednotlivé buňky parenchymu jsou schopny tvořit celé spektrum bílkovin, nejsou předurčeny k tvorbě určitého typu proteinu.

Tvoří se zde angiotenzinogen, který se spolupodílí na udržování krevního tlaku, IGF (*Insulin-like Growth Factor*, inzulinu podobný růstový faktor), jehož prostřednictvím působí růstový hormon adenohypofýzy, a v malém množství také erythropoetin, jež ovlivňuje erytropoézu. Syntézu proteinů v játrech inhibuje glukagon, vazopresin a pokles aminokyselin v krvi. Opačně působí inzulin, hormony štítné žlázy, růstový hormon a zvýšený přísun aminokyselin [13, 12].

2.1.2.5 DETOXIKAČNÍ FUNKCE

Mnoho exogenních i endogenních látek může být metabolizováno oxidací, redukcí, metylací nebo konjugací pomocí enzymů obsažených hlavně v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů. Hlavním z nich je cytochrom P450, který se podílí na biotransformaci mnoha eobiotik (např. steroidů) i xenobiotik (léků apod.).

Bilirubin je hlavní produkt rozpadu hemoglobinu. Je tvořen buňkami mononukleárního fagocytárního systému (v játrech tedy Kupfferovými buňkami v jaterních sinusoidách) a přenášen do hepatocytů. Konjugací kyseliny glukuronové

s bilirubinem za účasti enzymu glukuronyltransferázy vzniká bilirubinglukuronid (či dikuronid), který je rozpustný ve vodě a je uvolněn do žlučových kanálků.

Vzhledem k neurotoxickým účinku amoniaku je neopomenutelnou funkcí jater jeho účinné odstraňování z organismu. Amoniak vzniká jak v samotných játrech deaminací aminokyselin, tak přichází portální krví ze střev, kde vznikl činností střevní mikroflóry nebo přímo ve střevní sliznici z glutaminu. Existují dva systémy pro odstraňování amoniaku. Prvním z nich je ornithinový cyklus, který probíhá hlavně v periportální části acinu a v němž z amoniaku vzniká močovina. Druhou cestou je syntéza glutaminu probíhající převážně v perivenózní oblasti jaterního acinu. Druhý ze zmíněných systémů se uplatňuje více při situaci, kdy je potlačena tvorba močoviny v zájmu udržení acidobazické rovnováhy. Aby současně nedošlo k zvyšování hladin amoniaku, tvoří se glutamin a tento způsob je jakousi přechodnou zálohou pro detoxikaci amoniaku. [9, 15]

2.1.2.6 INAKTIVACE HORMONŮ, DEGRADACE CHOLESTEROLU

Játra jsou hlavním místem zániku mnoha látek, jako je inzulin, steroidní hormony, různé signální látky apod. Oxidací cholesterolu výhradně játrech vznikají žlučové kyseliny – kys. cholová a deoxycholová, které se v hladkém endoplazmatickém retikulu konjugují s glycinem a taurinem a přecházejí do žluče.

2.1.2.7 SEKRECE ŽLUČI

Exokrinním produktem jater je žluč. Je to alkalická, izotonická, nazelenalá tekutina, která je skladována ve žlučníku a vylučována do dvanáctníku. Má význam v emulgaci tuků v tenkém střevě. Kromě vody a elektrolytů obsahuje konjugované žlučové kyseliny, bilirubin, fosfolipidy a cholesterol.

2.1.2.8 ZÁSOBNÍ FUNKCE, ORGÁN KRVETVORBY

V játrech se skladují tuky, glykogen a vitamíny A, D, E, K a B12 a některé kovy: železo ve formě feritinu, kobalt a měď.

Játra se za normálních okolností jako orgán krvetvorby uplatňují jen v embryonálním období. V dospělosti se tato funkce může částečně obnovit při těžkém poškození kostní dřeně. [9, 13]

3 NAFLD, NASH

NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), nealkoholové ztukovatění jater je jedním z nejčastějších jaterních onemocnění ve vyspělých zemích [19]. Prevalence v populaci západního světa je 20-30 % u dospělých osob, z nichž 10-25 % progreduje do stádia NASH (*Non Alcoholic SteatoHepatitis*), nealkoholová steatohepatitida [17], která může dále vést k jaterní cirhóze a hepatocelulárnímu karcinomu i s jejich komplikacemi (např. portální hypertenze); jde o stavy, které v konečném stádiu mohou vyžadovat transplantaci jater.

3.1 DEFINICE, DIAGNOSTIKA

Diagnostickým kritériem pro NAFLD je hmotnostní podíl tuku v játrech větší než 5-10%, nebo > 5% hepatocytů s tukovými kapénkami při histologickém vyšetření bioptického vzorku (obr. 7) [16]. Protože biopsie se za pouhým účelem potvrzení diagnózy neprovádí, slouží k odhalení onemocnění hlavně ultrazvukové vyšetření jater, při kterém steatotická játra vykazují kvůli vyššímu podílu tuku vyšší echogenitu v porovnání s ledvinou. Není známý dostatečně specifický a senzitivní biochemický ukazatel NAFLD, ani NASH. Může se vyskytovat zvýšený poměr alaninaminotransferáz AST/ALT > 1 či alkalické fosfatázy, u většiny pacientů je ale obraz laboratorních vyšetření normální. Hlavně u NASH mohou být zvýšeny hladiny feritinu. Dále je u NASH přítomen zánět s následnou fibrotizací jaterní tkáně. [20]

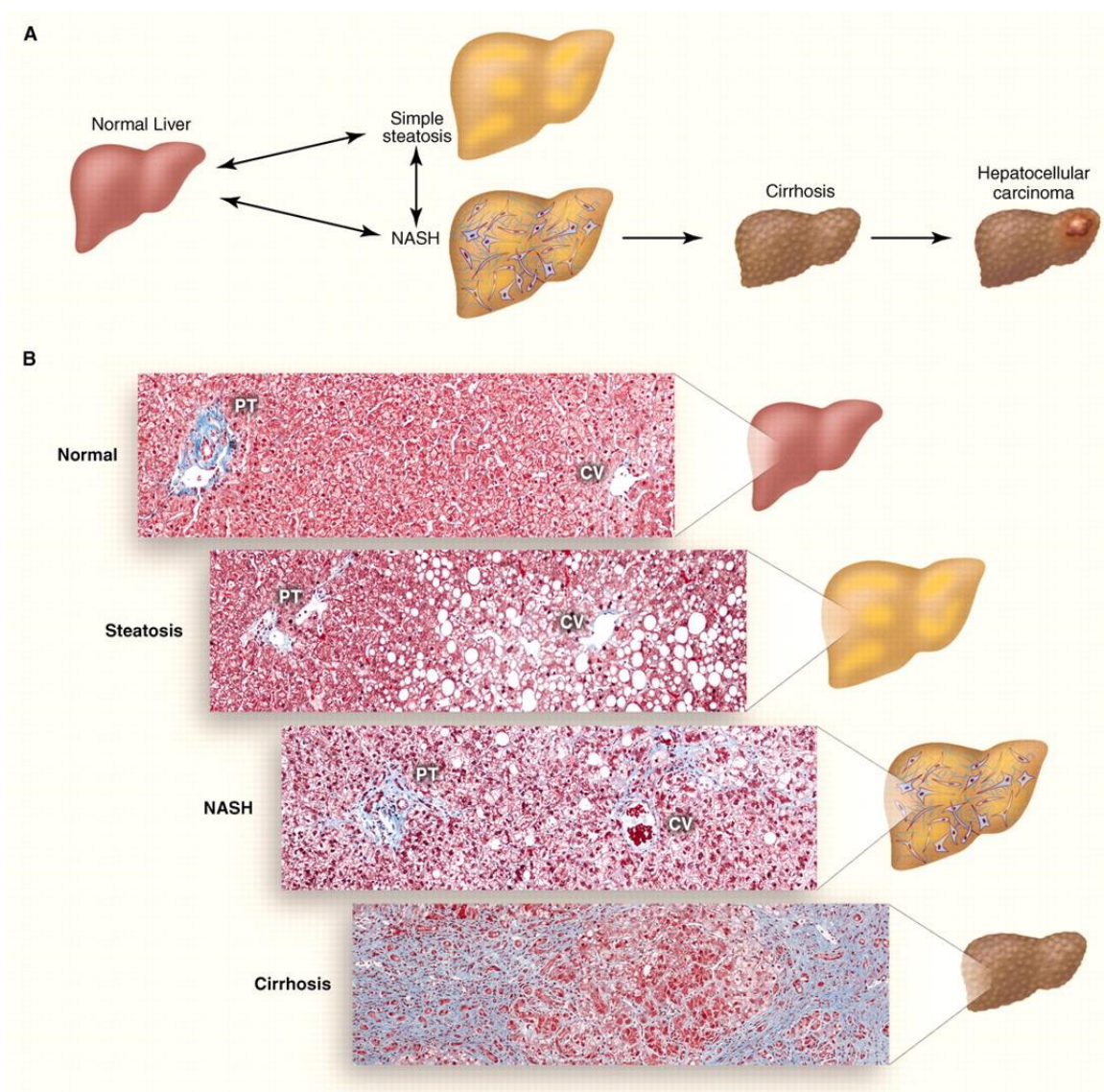
3.2 ETIOPATOFYZIOLOGIE

Přesný mechanismus vzniku NAFLD/NASH není znám. U NAFLD je známo, že dochází k narušení rovnováhy metabolismu lipidů (obr. 8a).

Ke ztukovatění jaterního parenchymu může dojít obecně z těchto příčin:

- Zvýšeného přívodu TAG (triacylglycerolů) a MK (mastných kyselin) v potravě
- Zvýšené syntézy MK v mitochondriích hepatocytů
- Snížení oxidace MK v mitochondriích hepatocytů
- Poruchy transportu TAG z hepatocytů (porucha syntézy VLDL lipoproteinů)

Obr. 7: Schématické znázornění změn v makroskopickém (A) i mikroskopickém (B) vzhledu jater při rozvoji steatózy a jaterní fibrózy



<http://www.sciencemag.org/content/332/6037/1519.figures-only> (29. 8. 2014)

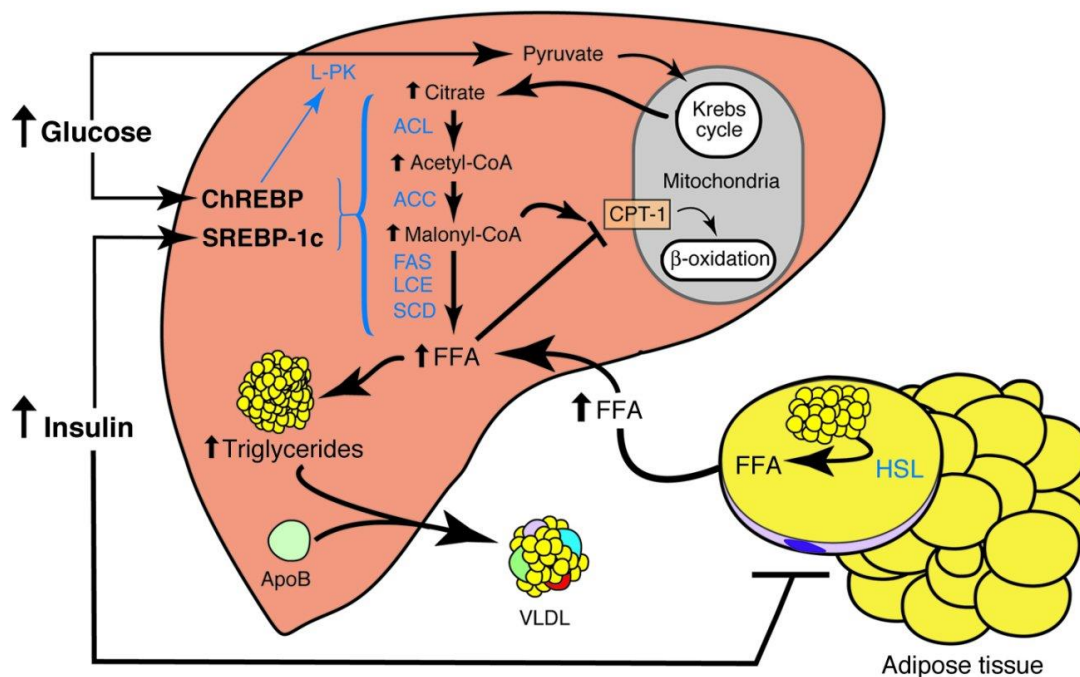
Mimo uvedené může dojít ke steatóze jater i při abúzu alkoholu, dále při poruše hormonální rovnováhy (např. v těhotenství) a v neposlední řadě jako následek toxického poškození jater (např. při intoxikaci léky). [15]

Mezi hlavní vyvolávající faktory NAFLD patří obezita, diabetes mellitus 2. typu (DM2), hyperlipidemie, poruchy výživy; sekundární příčinou bývá léčba kortikosteroidy.

NAFLD se společně s dalšími patofyziologickými pochody podílí na rozvoji tzv. metabolického syndromu, jehož dalšími součástmi jsou kromě NAFLD, také obezita, diabetes, hyperlipidemie, arteriální hypertenze a inzulinová rezistence. Poslední

ze jmenovaných je hlavním etiologickým faktorem úzce související nejen s DM2, ale i s NAFLD. Bylo zjištěno, že pacienti s NASH vykazují vyšší míru inzulinové rezistence než ti s NAFLD [20].

Obr. 8a: Schéma metabolických změn vedoucích ke kumulaci TAG v játrech [48a]



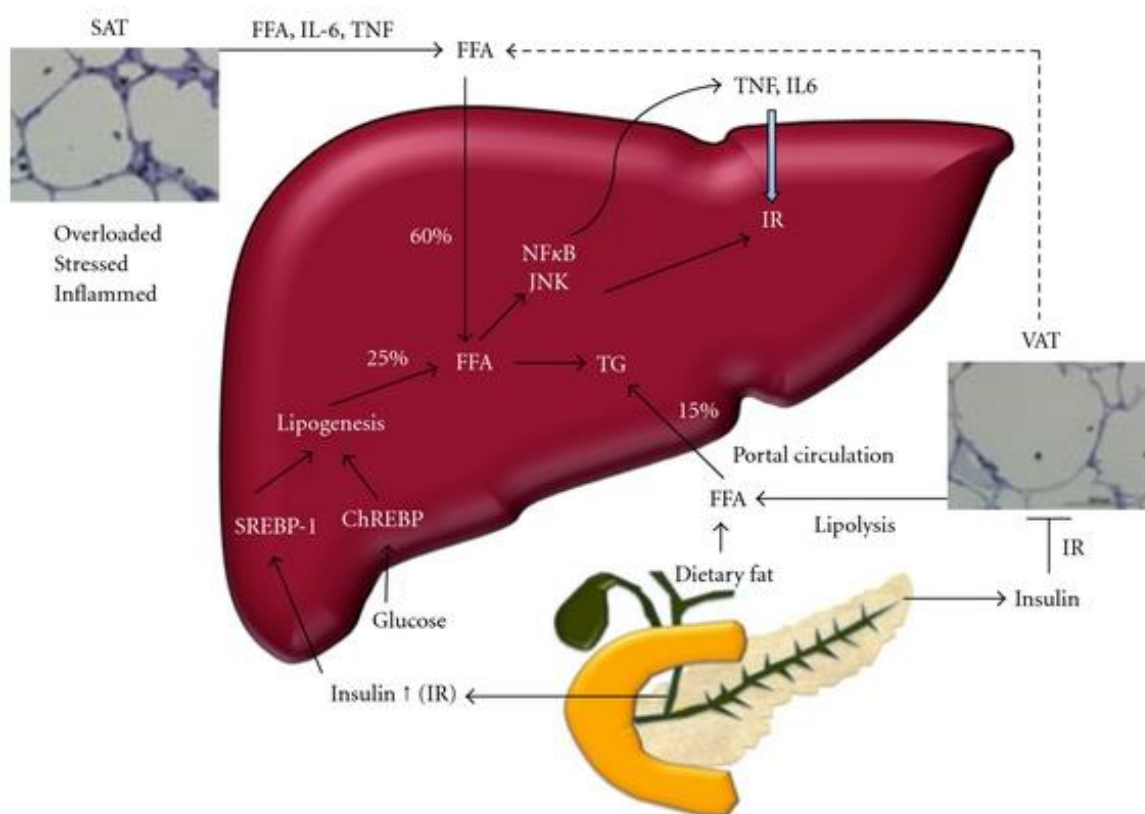
ChREBP – carbohydrate-responsive element-binding protein, **SREBP-1c** - sterol regulatory element binding protein-1c, **FFA** – free fatty acids, **HSL** - hormone-sensitive lipase, **ApoB** - apolipoprotein B, **VLDL** – very low density lipoproteins, **ACL** - ATP citrate lyase, **ACC** - acetyl-CoA carboxylase, **FAS** - fatty acid synthase, **LCE** - long-chain fatty acyl elongase, **SCD** - stearoyl-CoA desaturase, **CPT-1** - carnitine palmitoyl transferase-1, **L-PK** - liver pyruvate kinase

Samotná steatóza je stav reverzibilní a odstraněním vyvolávajících faktorů dojde k její úpravě. K rozvoji NASH je třeba dalšího zásahu. Steatotické hepatocyty jsou náchylnější k lipoperoxidaci, jejíž konečný produkt – malondialdehyd – spouští tvorbu řady cytokinů, které působí prozánětlivě a přitahují a aktivují imunokompetentní buňky (obr. 9). Bylo zjištěno, že aktivace Kupfferových buněk koreluje s mírou steatózy [20]. Vzhledem ke snížené mitochondriální β -oxidaci MK, roste β -oxidace v peroxizomech (obr. 8a), jejichž produktem je místo ATP peroxid vodíku. Fentonovou reakcí může docházet ke vzniku reaktivních kyslíkových radikálů, které účinky oxidačního stresu dále prohlubují.

Změny v produkci cytokinů způsobené oxidačním stresem mají za následek změny v buněčné signalizaci buněk jaterního parenchymu. Např. TGF α (společně s TGF β , *Transforming Growth Factor*, transformující růstový faktor) stimuluje Itovy buňky k produkci kolagenu typu I s následnou fibrotizací. Exprese TGF β je podle posledních studií indukována také leptinem [20]. Metabolismus leptinu hraje též důležitou úlohu ve vzniku obezity; která je jedním z klíčových faktorů souvisejících s inzulinovou rezistencí (obr. 8b).

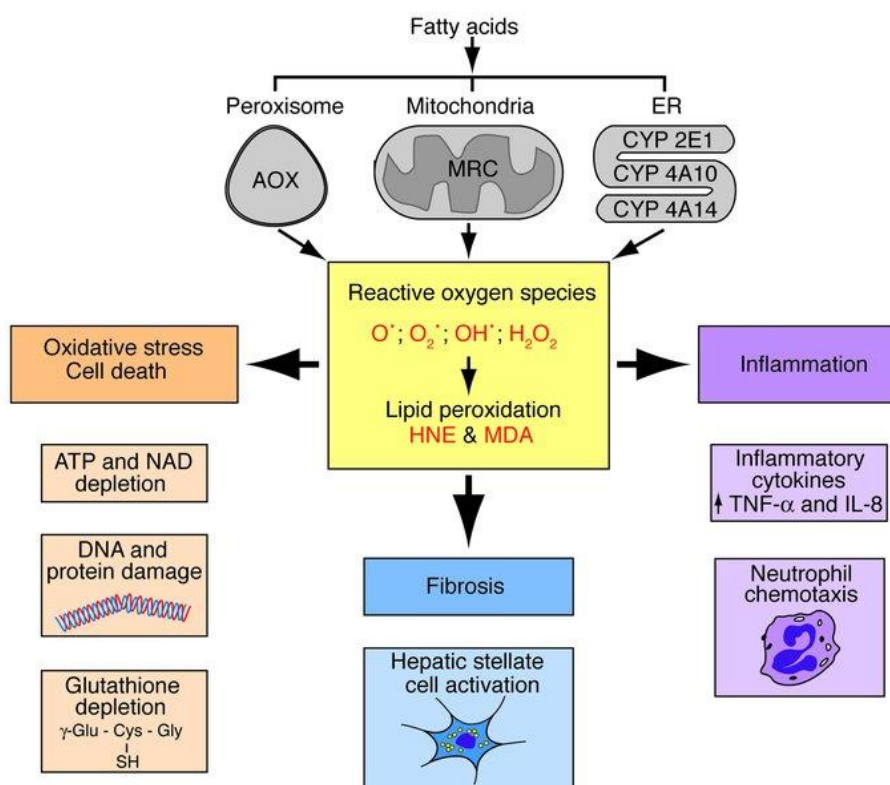
Svou roli hraje zřejmě i úzký anatomicko-fyziologický vztah mezi játry a střevem, kdy střevní produkty významně ovlivňují metabolismus inzulinu, ať už jde o látky čistě endogenního původu jako v případě inkretinů, nebo o produkty mikrobiálního osídlení střeva. Je známo, že strava bohatá na tuky a jednoduché sacharidy mění složení střevního mikrobiálního osídlení. [18].

Obr. 8b: Mechanizmu jaterní steatózy, s ohledem na inzulinovou rezistenci [48b]



ChREBP – carbohydrate-responsive element-binding protein, **FFA** – free fatty acids, **IR** – insulin resistance, **SAT** – subcutaneous adipose tissue, **SREBP-1c** – sterol regulatory element binding protein-1c, **TG** – triglycerides, **VAT** – visceral adipose tissue

Obr. 9: Schéma patofyziologických mechanismů vedoucích k NAFLD [71]



AOX – acyl-CoA oxidase, ATP - adenosine triphosphate, ER - endoplasmic reticulum, HNE – hydroxynonenal, IL-8 – interleukin 8, MDA – malondialdehyde, MRC – mitochondrial respiratory chain, NAD - nicotinamide adenine dinucleotide, TNF- α – tumour necrosis factor α

3.3 FARMAKOLOGICKÁ TERAPIE

Terapie NAFLD/NASH se opírá hlavně o režimová opatření jako je celková změna životního stylu s důrazem na snížení hmotnosti, zvýšení fyzické aktivity, které vedou ke snížení TAG v játrech.

Antiobezitikum orlistat podle provedených studií příznivě ovlivňuje NAFLD/NASH [22]. Mechanismus není znám a účinky byly prozatím testovány jen na malých skupinách. Nadějnou hůdkou budoucnosti jsou nová antidiabetika, analoga GLP-1 (např. liraglutid a exenatid) a gliptiny (např. sitagliptin). Nedávné provedené *in vitro* a *in vivo* studie uvádějí GLP-1 jako možnou terapii NAFLD [20]. Terapeutický účinek by se měl opírat hlavně o modulaci metabolismu lipidů v játrech a ovlivnění inzulinové signální kaskády v hepatocytech. Tyto účinky mohou být vyvolány buď přímo – stimulací GLP-1 receptoru, který je v játrech přítomen, nebo nepřímo – redukcí váhy. Několik studií prováděných na lidských hepatocytech prokázaly terapeutické účinky agonistů GLP-1 receptoru ve zpomalení rozvoje NAFLD [23].

3.4 ACETAMINOFEN

Acetaminofen (APAP, paracetamol) je běžně užívané, pro pacienty vzhledem k volnému prodeji dobře dostupné, analgetikum a antipyretikum. Při dodržování terapeutického dávkování jde o bezpečný lék, který může být podáván i dětem. Předávkování je ovšem nejčastější příčinou akutního selhání jater v některých vyspělých zemích. [70]. Za normálních okolností je hlavní cestou biotransformace APAP konjugace, hlavně s kyselinou glukuronovou a sulfátem, méně ostatní metabolické cesty zpracování. Při dávce větší než 5 g je konjugální kapacita jater překročena a APAP je ve větší míře metabolizován alternativní cestou pomocí cytochromu P 450, CYP 2E1. Tímto způsobem ale vznikají toxické meziprodukty, jež při snížené koncentraci glutathionu, nebo jeho vyčerpání, jaterní tkáň poškozují. [24] Citlivost jater k APAP může být zvýšena různými běžně konzumovanými látkami, např. alkoholem, i větším množstvím kávy a čaje. Antidotem při intoxikaci APAP je N-acetylcystein, který coby prekurzor silného antioxidačního činidla glutathionu ovlivňuje mechanismus oxidačního stresu v buňkách.

4 ANALOGA GLP-1

GlP-1 (*glucagon-like peptide 1*) je látka ze skupiny inkretinů, jež v lidském těle ovlivňuje uvolňování inzulínu. Jeho analoga se poměrně nedávno začala využívat při léčbě diabetu 2. typu. Pro své široké účinky jsou skupiny těchto látek stále intenzivně experimentálně i klinicky testovány.

4.1 INKRETINY

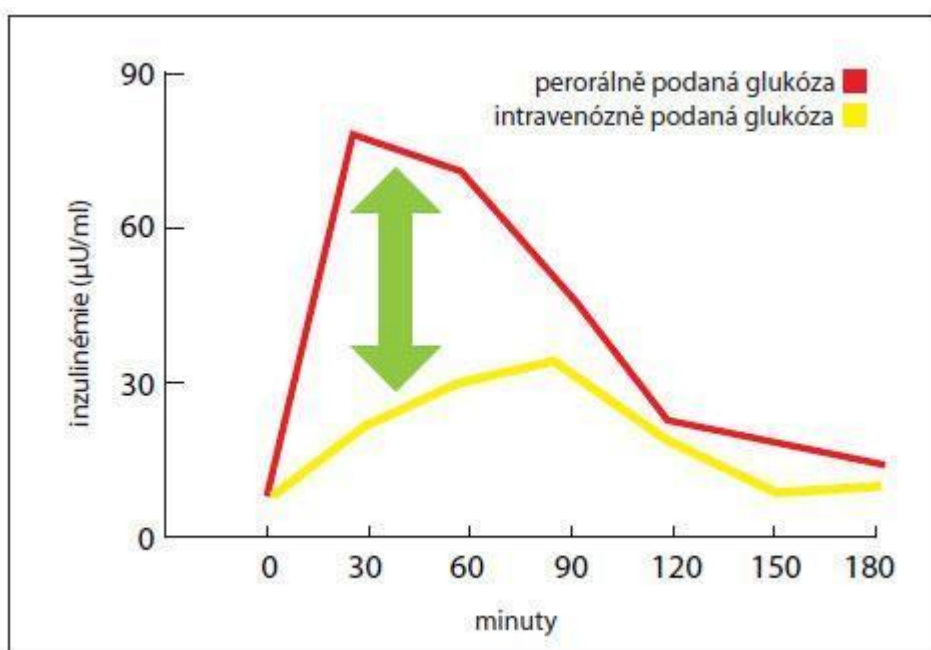
Inkretiny jsou hormony uvolňované do krevního oběhu převážně z horní etáže střeva jako odpověď na stimulaci střevní sliznice potravou. Vedou především ke zvýšení inzulínové sekrece pankreatu, a jsou tak zásadní pro udržení glukózové homeostázy.

Již v roce 1902 britští fyziologové Bayliss a Starling na podkladě svých studií zpochybnili tvrzení, že k regulaci sekrece pankreatu dochází prostřednictvím nervových impulzů z trávicího traktu. Během dalších tří let zjistili, že pankreatická sekrece je ovlivňována látkou, uvolňovanou z trávicího traktu, nazvali ji sekretin. Starling v souvislosti s těmito studiemi poprvé použil pojem hormon, a to v obecném slova smyslu pro látky uvolňované v jedné části organismu a působící v jeho jiné části, kam se dostanou prostřednictvím krevního oběhu. V dalších letech proběhly první experimenty s perorálním podáváním střevních extraktů, které lze považovat za první pokusy s inkretinovou léčbou. Dalšímu zájmu se tyto látky mohly těšit až po objevení inzulínu Bantingem a Bestem v roce 1921, kdy zájem o možnosti léčby diabetu opět vzrostl. Hlavní výzkumné snahy se ale soustřeďovaly právě na inzulín. Až v roce 1967 Brown popsal aminokyselinovou sekvenci peptidu izolovaného ze střevní sliznice, který nazval gastrický inhibiční peptid (GIP). Záhy zjistil, že objevený peptid má také inzulínotropní účinky, a navrhl proto název glukózo-dependentní inzulínotropní peptid, který je používán dodnes. V roce 1985 byl objeven další z inkretinových hormonů – GLP-1. [28]

Vliv těchto hormonů na sekreci inzulínu je často označován jako tzv. inkretinový efekt. [29] Ten se popisuje jako rozdíl v sekreci inzulínu po perorálním příjmu a intravenózním podáním stejného množství glukózy (obr. 10). Uvedený jev je důkazem koexistence mechanismu, který pomáhá redukovat hladinu glykémie. Perorální podání vede až ke dvojnásobně efektivnější sekreci inzulínu z buněk pankreatu než po podání intravenózním, proto je tento systém regulace glykémie více než nezbytný pro udržení

normální koncentrace glukózy v krvi. [30]. Inkretiny ovlivňují homeostázu glukózy několika hlavními mechanismy: 1) ovlivňují uvolňování inzulínu, a to v závislosti na zvýšení hladiny glykémie, 2) postprandiálně snižují uvolňování glukagonu a 3) ovlivňují vyprazdňování žaludku. [31] Definici inkretinových hormonů v současné době splňují pouze dvě látky: GIP (glukózodependentní inzulinotropní peptid) a GLP-1. Současná terapie založená na inkretinech se opírá především o druhou z nich.

Obr. 10: Inkretinový efekt - hladiny inzulínu v krvi po podání glukózy perorálně a intravenózně u neobézních zdravých osob Podle Perley, M., et al. [44]



Používaný pojem inkretinová léčba diabetu spočívá v podávání látek, které nějakým způsobem zasahují do inkretinového metabolismu. Patří sem léčba pomocí GLP-1 agonistů, ale také inhibitorů dipeptidyl-peptidázy, jejichž účinek tkví ve snížení inaktivace aktivní formy endogenních inkretinů, a tím zesílení jejich účinků.

4.1.1 GLP-1

Glucagon like peptid je látka produkovaná v disperzním endokrinním systému L-buňkami tenkého střeva, hlavně distálního úseku ilea a proximální části colon [32]. K jejímu uvolnění dochází postprandiálně. Působí na specifické receptory, zejména v Langerhansových ostrůvcích.

Stimuluje glukózo-dependentním způsobem sekreci inzulínu; a amylinu (v β -buňkách) a somatostatinu (v δ -buňkách).

Vzniká jako produkt posttranslačního štěpení genu pro glukagon účinkem enzymu prohormonální konvertázy. Kromě GLP-1 a vlastního glukagonu dojde štěpením proglukagonového genu k uvolnění GLP-2, který ovšem nemá vliv na inzulínovou sekreci, ani neovlivňuje glykemii, nepatří tedy k inkretinům. Aminokyselinová sekvence GLP-1 se s glukagonovou shoduje ve více než 50%. Tenké střevo není jediným místem, kde dochází k expresi proglukagonového genu. Děje se tak i v α -buňkách pankreatu, v některých chuťových buňkách jazyka a v neuronech v oblasti mozkového kmene a hypothalamu [29, 28].

Mechanismus účinku GLP-1

GLP-1 působí přes specifický receptor GLP-1R. Jde o receptor spážený s G-proteinem, jehož aktivace vede ke zvýšení hladin intracelulárního cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu) a vápníkových iontů a následně k aktivaci celé řady signálních kaskád. Dojde k zapojení fosfatidylinositol 3 kinázy, proteinkinázy B, MAP (mitogenem aktivované proteinkinázy), fosfolipázy A a dalších (obr. 9). GLP-1 receptor je exprimován v pankreatu, v mozku, srdci, ledvinách a gastrointestinálním traktu.

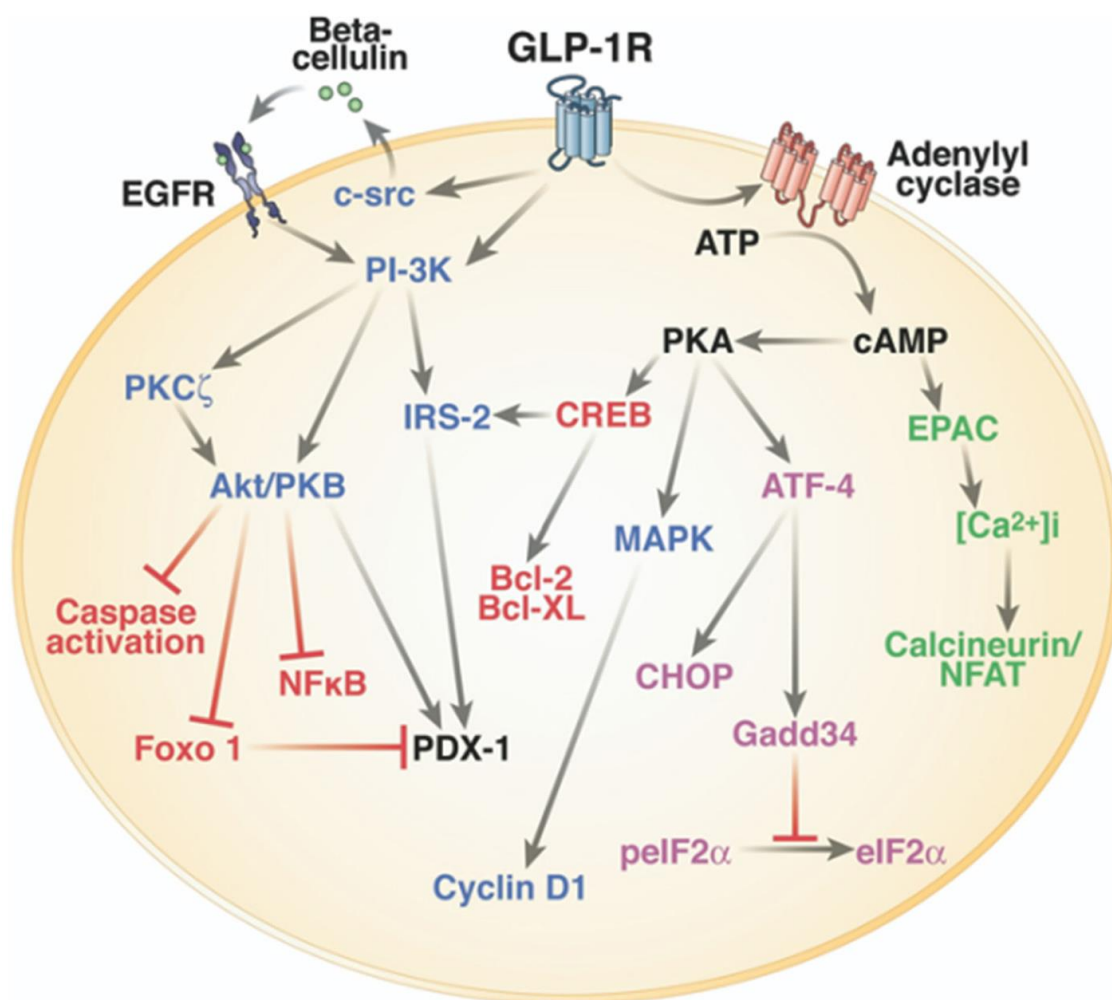
Účinky GLP-1 na pankreas

V případě pankreatu vede navázání GLP-1 na GLP1-R ke zvýšení glukózodependentní inzulínové sekrece. Zásadní pro tuto stimulaci je proteinkináza A, která spouští kaskádu fosforylačních reakcí včetně aktivace draslíkových kanálů na endoplazmatickém retikulu a GLUT 2 (glukózových přenašečích typu 2). Další významné signální komponenty zahrnují fosfatidyl-inozitol 3 kinázu a proteinkinázu C.

V experimentech vede GLP-1 ke stimulaci syntézy a zvýšení zásob inzulínu v sekrečních granulích β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Hormon působí též na molekulární úrovni a to tak, že tlumí kaspázu 3 a naopak podporuje Bcl-2.

Zvyšuje stabilitu inzulinové mRNA, transkripci a expresi inzulinového genu. GLP-1 stimuluje proliferaci β -buněk pankreatu a je schopen inhibovat jejich apoptózu (u myši prostřednictvím snížení aktivity kaspázy, aktivací proteinkinázy A a MAP). [33] Dalším důležitým mechanismem ochrany β -buněk před apoptózou a podpora jejich proliferace je aktivace tzv. pankreatického duodenálního homeobox proteinu-1 (PDX-1), který hraje významnou roli při stimulaci proliferace duktálních pankreatických buněk a jejich případnou diferenciaci v β -buňky (obr. 11) [32].

Obr. 11: Signální kaskáda aktivace GLP-1R [34]

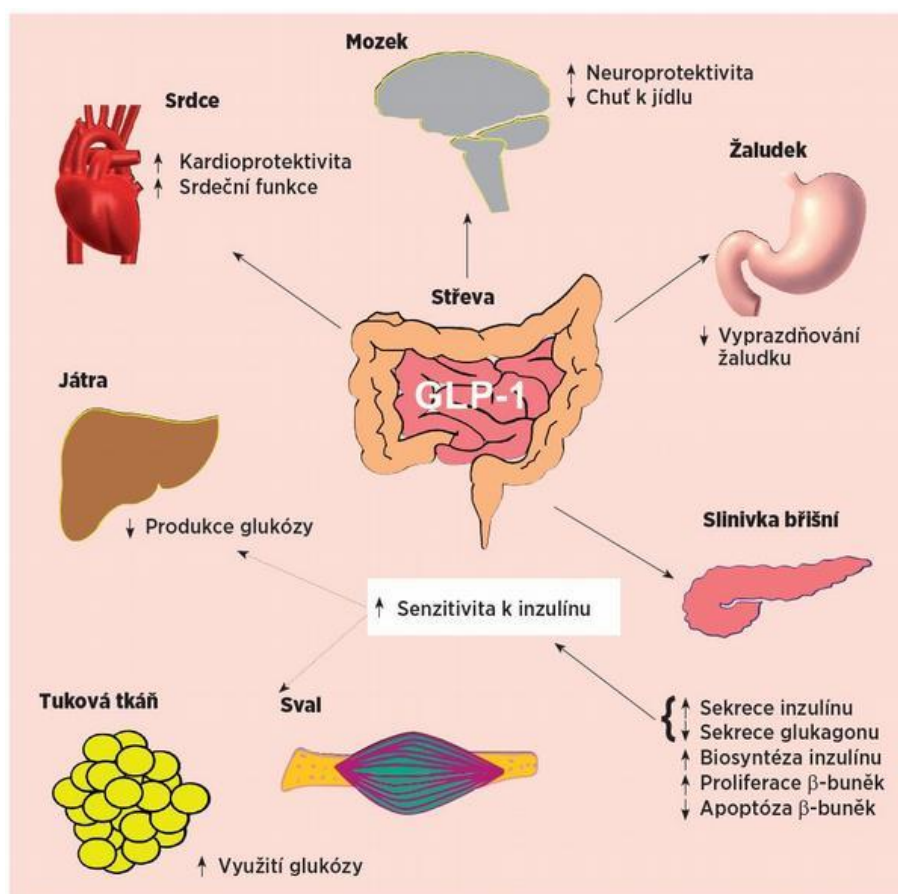


Extrapankreatické účinky GLP-1 [35]

● Účinky na nervový systém a příjem potravy

GLP-1 zpomaluje vyprazdňování žaludku (pravděpodobně dáno přímou interakcí s vagovými nervovými zakončeními přímo v místech produkce GLP-1). Předpokládá se, že GLP-1 produkované ve střevě působí na aferentní zakončení *n. vagus*, který vede informace do svého *ganglion inferius* (*ganglion nodosum*), uloženého při *foramen jugulare*. Dále vede ke snížení sekrece pankreatických trávicích enzymů a k celkovému snížení příjmu potravy. Také GLP-1 podaný intracerebrálně vede k tlumení pocitu hladu a snížení příjmu potravy. Zdá se, že nejstěžejnějším je pro centrální působení hormonu nucleus arcuatus, při jehož experimentálním zničení jsou centrální účinky GLP-1 potlačeny.

Obr. 12: Účinky GLP-1 v organismu



(<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/kardiovaskularni-ucinky-glukagon-like-peptidu-1-a-jeho-agonistu-463821>, 25. 4. 2014)

● Kardioprotektivní účiny

GLP-1R je v kardiomyocytech exprimován, ale zatím nejsou k dispozici jasné potvrzující klinické studie o účinku GLP-1 na srdeční sval. Co se glukagonu týče, má na kardiomyocyty prokazatelný pozitivní inotropní a chronotropní účinek [35].

Většina experimentů, která proběhla převážně na myších a potkanech, naznačuje, že GLP-1 srdeční funkci ovlivňuje. Na myších se projevovaly pozitivní inotropní i chronotropní účinky, stejně jako u glukagonu, v jiné studii podávání GLP-1 způsobilo zvýšení krevního tlaku (TK) a tepové frekvence. Naopak dlouhodobé podávání GLP-1 nebo jejich agonistů vedlo u diabetických experimentálních modelů spojených s hypertenzí k poklesu TK. Provedeno bylo několik specifitěji zaměřených studií, např. na modelech reperfuze poškození myokardu bylo prokázáno, že podání GLP-1 vede ke zmenšení infarktového ložiska, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Přesný mechanismus, jakým GLP-1 ovlivňuje srdeční činnost, zatím znám není. Uvažuje se jednak o přímém působení prostřednictvím GLP-1R, jednak o nepřímém vlivu prostřednictvím zlepšení poměrů v ovlivnění hladin glukózy a inzulinu.[35, 67]

● Behaviorální a neuroprotektivní účinky

Vzhledem k expresi GLP-1 v celé řadě oblastí CNS jsou zkoumány účinky i na nervovou tkáň. Podle dostupných studií na zvířatech by tento hormon mohl mít vliv na zvýšení pohybové aktivity a aktivity při hledání potravy. GLP-1 má stejně jako na buňky pankreatu proliferativní a antiapoptotické účinky i na neurony v CNS. Uvažuje se tedy o možném příznivém vlivu GLP-1 u nerodegenerativních chorob typu vaskulární demence, Alzheimerovy nemoci, demence v důsledku prodělaných cévních mozkových příhod a u Parkinsonovy nemoci. [28]

● Účinky na játra

Účinky na játra jsou velmi důležité z hlediska antidiabetických účinků GLP-1. Následkem snížení sekrece glukagonu v buňkách pankreatu dojde k poklesu produkce glukózy v játrech a k jejímu sníženému uvolňování z hepatocytů.

Sekrece GLP-1 je ovlivňována mnoha faktory. Mezi zásadní patří stimulace potravou, ať už jde o jídla s vysokým obsahem tuků a sacharidů, nebo jednotlivých výživových složek. Vzrůst GLP-1 probíhá ve dvou fázích, první z nich asi 5-15 min. po

požití potravy, druhá fáze nastupuje 30-60 min. po jídle [29]. Uvolňování GLP-1 mohou potencovat některé hormony, např. leptin a iznulin (obr. 12) [29] a jak již bylo zmíněno výše, regulace je ovlivňována i nervově prostřednictvím *n. vagus*.

Asi jen 10 - 15 % z celkového GLP-1 pronikne do systémové cirkulace, zbytek je degradován již ve střevní mikrocirkulaci nebo játrech. GLP-1 má v krevním oběhu velmi krátký poločas, je inaktivován enzymem dipeptidyl peptidázou 4 (DPP 4) během 2-3 minut, GIP během 5-7 min. Dalším enzymem, který je schopen GLP-1 štěpit, je neutrální endopeptidáza (NEP). Rychlost odbourávání se v provedených studiích u zdravých lidí a diabetiků nelišila (tento mechanismus se tedy na sníženém působení GLP-1 u diabetiků 2. typu nepodílí. [28])

4.1.2 VLASTNÍ ANALOGA GLP-1

Ačkoliv má hormon GLP-1 sám o sobě vhodné vlastnosti využitelné k léčbě diabetu 2. typu, jeho klinické využití omezuje jeho rychlá inaktivace enzymy (DPP4 a NEP). Tento jev se dá obejít dvěma způsoby. Prvním z nich je použití inaktivátorů DPP4 (tzv. gliptiny); druhým pak využití analog GLP-1, která mají stejné účinky, ale pro svou pozměněnou strukturu jsou schopny v cirkulaci vydržet déle.

GLP-1 analogy neboli inkretinová mimetika či inkretinová sekretagoga jsou u nás zatím používány dva zástupci. Prvním z nich je exenatid, který byl extrahován ze slin ještěra korovce jedovatého (*Heloderma suspectum*) [44], druhým je liraglutid. Další jako např. albiglutid, lixisenatid a taspoglutid jsou v různých fázích klinického testování. [36]

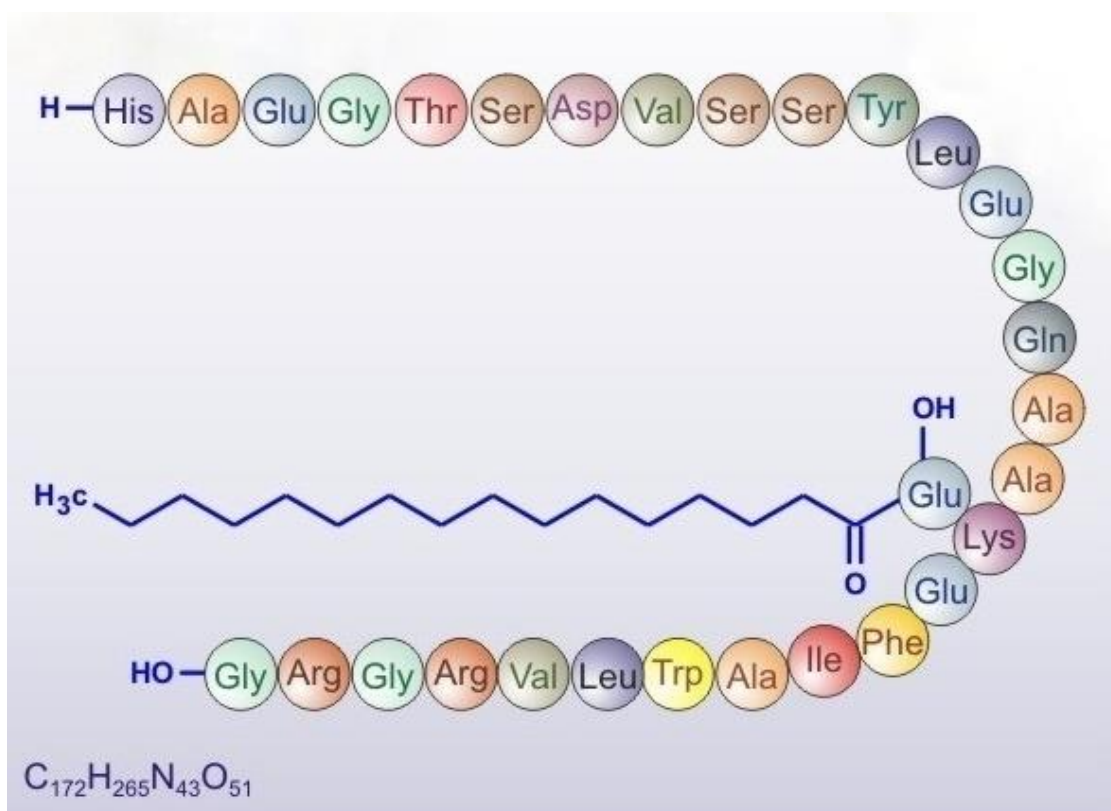
Analogy mají stejné účinky jako vlastní inkretiny - stimulují sekreci inzulinu a snižují tím postprandiální hyperglykémii, inhibují sekreci glukagonu.

4.1.2.1 LIRAGLUTID

Patří do skupiny tzv. inkretinových mimetik, označovaných též jako agonisté GLP-1 receptoru. Je vyrobený rekombinantní DNA technologií v *Saccharomyces cerevisiae* a znám pod obchodním názvem Victoza. Poprvé byl registrován v r. 2009 [37].

Jedná se o agonistu GLP-1 s dlouhým účinkem. Prodloužení účinku je docíleno vyšší odolností vůči působení endopeptidáz způsobenou záměnou lysinu v pozici 34 za arginin a navázáním kyseliny palmitové na lysin v pozici 26 prostřednictvím kyseliny γ -glutamové (obr. 13). [38]

Obr. 13: Schématické znázornění struktury liraglutidu



(<http://focus-blog.pharmxplorer.at/2010/02/liraglutid-victoza%C2%AE-ein-neues-antidiabetikum/>, 25. 4. 2014)

Liraglutid (LIRA) je z 97% strukturálně shodný s endogenním GLP-1 [39]. Má vysokou afinitu ke GLP-1 receptoru a dovede ho dobře aktivovat. Následkem aktivace se v β -buňce zvýší syntéza cAMP a přes kaskádní signální dráhu (viz. výše zmíněný

mechanismus účinku GLP-1) zvýší sekrece inzulínu. To vše v závislosti na glykémii. Stejným mechanismem proběhne v α -buňkách snížení sekrece glukagonu. [40]

LIRA účinně snižuje glykémii postprandiálně i glykémii nalačno, a to v závislosti na dávce. Výsledkem je významné snížení glykovaného hemoglobinu (konkrétně HbA1c)¹, což je jeden z ukazatelů celkové zlepšení kompenzace u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM 2) [45].

Přípravek Victoza je vhodný v kombinační terapii. Je indikován pro léčbu DM 2 jako lék druhé volby u dospělých s cílem dosáhnout kontroly glykémie v zásadě ve dvou situacích. V kombinaci s metforminem nebo sulfonylureou u pacientů s nedostatečnou kontrolou glykémie, přestože již bylo dosaženo maximální tolerované dávky při monoterapii metforminem nebo sulfonylureou. Nebo v kombinaci s metforminem a sulfonylureou nebo metforminem a thiazolidindionem u pacientů s nedostatečnou kontrolou glykémie navzdory probíhající kombinované léčbě. Hlavním podpůrným kritériem pro jeho volbu je BMI > 35 kg/m². [37]

Klinickou účinnost LIRA zkoumal program LEAD (*Liraglutide Effects and Action in Diabetes*), jehož cílem bylo porovnání účinku na glykémii a tělesnou hmotnost u pacientů s DM2 v několika terapeutických větvích. Porovnával se účinek liraglutidu v monoterapii, ve dvoj či trojkombinaci a byl porovnáván účinek s dalšími antidiabetiky - glimepiridem, metforminem, glitazonem, inzulínem glarginem a exenatidem. [39]

Srovnání s exenatidem

LIRA vykazuje nižší stupeň imunogenicity, což je pravděpodobně dáno tím, že molekula liraglutidu je homologní s endogenním GLP-1z 97%, exenatidu pouze 53%. [38]

LIRA je účinnější ve smyslu snížení HbA1c, kde pokles byl o 0,3% vyšší než u exenatidu. Ve srovnání s exenatidem účinkuje LIRA déle, vzhledem k farmakokinetice vykazuje nižší kolísání koncentrací v plazmě (což umožní jeho podávání jedenkrát denně, na rozdíl od exenatidu, který musí být podáván dvakrát) a méně ovlivňuje vyprazdňování žaludku.

¹ Glykovaný hemoglobin vzniká neenzymovou glykací hemoglobinu v erytrocytech; jeho koncentrace odráží množství glukózy v krvi po celou dobu života erytrocytu, tj. cca 120 dnů; parametr se používá ke kontrole kompenzace DM2, konkrétně jeho nejstabilnější frakce HbA1c [41]

Co se týče dávkování, nejsou doporučovány dávky LIRA větší než 1,8 mg za den. Počáteční dávka je 0,6 mg denně, po jednom týdnu by měla být zvýšena na standardní dávku 1,2 mg za den. [42]

Místo aplikace může být měněno bez úpravy dávkování, je však doporučené podávání do míst, která jsou pro pacienta nejvhodnější – břicho, stehno, proximální část paže. Přípravek je distribuován v aplikátorech [42] – viz. obr. 14. Podává se subkutánně, jednou denně, nezávisle na jídle. Jeho výhodou je, že kromě použití v kombinaci se sulfonylureou není nutný selfmonitoring glykémie.

Obr. 14: Injekční aplikátor přípravku Victoza (Liraglutidum)



<http://www.diabetes-ratgeber.net/medikamente/inkretin-analoga> (13 .5. 2014)

Díky jeho modifikované struktuře oproti endogennímu GLP-1 dochází k pomalému vstřebávání z podkoží, což je jeden z mechanismů dlouhodobějšího působení. Při intramuskulárním injekčním podání má látka biologický poločas pouze půl hodiny. Ke zpomalení absorpce dojde i tím, že molekula liraglutidu tvoří v přípravku heptamery. Absolutní biologická dostupnost po subkutánním podání je cca 50 %. LIRA se váže na plazmatické proteiny, a to více jak z 98 %. Farmakologicky účinná je pouze volná forma a vysoká vazba převážně na albumin je dalším mechanismem, který prodlužuje účinek liraglutidu a čas potřebný k eliminaci z organismu na 10 až 15 hodin. Klinicky významný je fakt, že středně těžká ani těžká renální insuficience farmakokinetiku přípravku neovlivňuje. [38] Nebyl prokázán ani negativní vliv na osoby s DM 2. typu a pacienty s jaterní insuficiencí.

Z hlediska nežádoucích účinků se liraglutid jeví jako bezpečný, incidence hypoglykemií byla dokonce srovnatelná s placebem. Významněji vyšší riziko tohoto

stavu je v kombinaci LIRA se sulfonylureou. Mezi nejčastěji objevované nežádoucí účinky patří dyspeptické potíže, nauzea, zvracení a průjem [46]. Většina z těchto nežádoucích příznaků odezní do čtyř týdnů od zahájení léčby a ze strany pacientů jsou dobře tolerovány [38].

U hlodavců byla prokázána vyšší incidence tumorů C-buněk štítné žlázy, u 20 měsíční terapie u primátů tento vliv pozorován nebyl. Význam popsané zvýšené incidence pro člověka je pravděpodobně velmi nízký, přesto zatím nemůže být zcela vyloučen. Uvažován byl i vliv agonistů GLP-1 na zvýšený výskyt pankreatitidy a rakoviny slinivky břišní. Zatím nejsou přesvědčivé důkazy o tom, že by toto riziko bylo vyšší, než u pacientů neléčených agonisty GLP-1. LIRA není doporučován např. u pacientů s gastroparézou či zánětlivým onemocněním střev. Vysloveně nesmí být užíván u pacientů s diabetem 1. typu a vzhledem k prokázané reprodukční toxicitě na zvířatech také u žen v těhotenství [37, 40].

DM 2. typu a liraglutid

Diabetes mellitus je skupina metabolických onemocnění charakterizovaných hyperglykemií vznikající v důsledku defektů inzulinové sekrece, poruchy účinku inzulinu v cílových tkáních nebo kombinace obojího (definice Americké diabetologické asociace, 2008). Dlouhodobé zvýšení glykémie může vést a zpravidla vede k poškození, dysfunkci až úplnému selhání řady orgánů. Nejčastěji dochází k postižení zraku, ledvin, nervů a krevních cév. DM je civilizační chorobou, ke které přispívá vysoký výskyt obezity a obecně stále se zhoršující životní styl nejen v ČR, ale ve většině zemí vyspělého světa. U diabetiků 2. typu jde o poruchu inzulinové sekrece jak kvantitativního, tak kvalitativního rázu. V časných fázích diabetu je sekrece inzulinu kompenzatorně zvýšena, nedochází však k dostatečně rychlému vzestupu sekrece inzulinu po požití potravy (chybí tzv. první rychlá fáze inzulinové sekrece). Významnou složkou patogeneze této nemoci je snížení inkretinového efektu způsobeného poruchou v inkretinovém systému (viz. výše). DM je obvykle součástí tzv. metabolického syndromu, který kromě DM zahrnuje další odchylky jako arteriální hypertenze, centrální obezita, dyslipidemie, endoteliální dysfunkce a protrombotické stavy. Všechny uvedené poruchy významně zvyšují riziko kardiovaskulárních chorob a kardiovaskulární komplikace jsou nejčastější příčinou mortality i morbidit nejen u pacientů s diabetem. [43]

V průběhu onemocnění dochází k ubývání β -buněk pankreatu a zhoršování jejich funkce. Experimentálně bylo prokázáno, že LIRA snižuje apoptózu těchto buněk a vede ke zvýšení jejich hmoty u laboratorních zvířat. Velkou výhodou terapie liraglutidem je minimální riziko hypoglykémie. Také výrazný pokles hmotnosti společně s poklesem krevního tlaku má velmi příznivý vliv na diabetickou léčbu. Hlavním parametrem hodnotícím úspěšnou kompenzaci diabetiků je hodnota glykovaného hemoglobinu, která by u dobře kompenzovaných pacientů neměla přesahovat hodnotu 6 % [41]. I v tomto ohledu jsou účinky liraglutidu více než uspokojivé. Podle dostupných údajů jsou aktuální rizika spojená s léčbou malá a výsledky klinických studií naznačují možný dlouhodobější příznivý efekt na kardiovaskulární patofyziologické pochody.

5 ZVÍŘECÍ MODEL Y A MODEL Y IN VITRO

Metody používané v experimentálním výzkumu lze rozdělit do třech základních skupin: metody *in vivo* („v živých organizmech“), metody *in vitro* („ve skle“) a *in silico* („predikce pomocí počítačových simulací“). Všechny mají své výhody i nevýhody. Pro biologicky zaměřené experimentální studie je použití metod *in vivo* ve větší či menší míře nezbytné. V každém případě se při jejich plánování a uskutečňování musí dodržovat etická pravidla pro práci se zvířaty. Platí zásady dodržování 3 R: *reduction*, *refinement*, *replacement*. Pod pojmem *reduction* se skrývá *snížení* počtu použitých zvířat, a to především vhodným projektováním pokusu, tj. použitím správných druhů zvířat, vhodných statistických zpracování a vhodné sdílení zvířat pro různé pokusy. *Refinement* – „zjemnění“ – znamená šetrné zacházení, zajištění vhodného ustájení, minimalizování stresových vjemů. Pokud to není předmětem pokusu, zvířeti nesmí být způsobena bolest (použití vhodné analgezie). *Replacement*, *nahrazení* pokusných zvířat tam, kde jejich použití není bezpodmínečně nutné – např. metodikami *in vitro*. Orgány, ze kterých jsou získávány buňky pro kultivaci, se sice odebírají z živého zvířete, ale kultury lze využít pro testování více koncentrací či látek, navíc je možno zužítkovat více orgánů pokusného zvířete (např. v rámci jednoho ústavu). Pokusy musí být schváleny příslušnou Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb.

5.1 POTKANI S INDUKOVANÝM NEALKOHOLOVÝM ZTUKOVATĚNÍM JATER

NAFLD potkani jsou jedinci, u kterých byla vysokotukovou dietou (*HF – high fat – diet*) navozeno nealkoholické ztukovatění jater. Potkani jsou krmeni vysokotukovou dietou po dobu delší než 3 týdny (obvykle 6 týdnů) [18]. Již při operaci potkanů za účelem jaterní izolace je zřejmé vysoké množství viscerálního tuku; i na samotných játrech mohou být vidět steatotické změny (obr. 13) i makroskopicky (světlejší barva). Tkáň zatížená vysokým obsahem tuků častěji vykazuje mitochondriální dysfunkci, dříve či později se u nich objevuje inzulinová rezistence, zvýšená citlivost na bakteriální endotoxin. Všechny tyto odchylky mohou mít za následek změny v jaterních signálních drahách s následným rozvojem jaterního zánětu a s postupem času progresi jaterní fibrózy a cirhózy. [69] Tyto potkani jsou využívány

pro modelování jaterní steatózy, obezity, dyslipidemie a dalších patologií. NAFLD se dnes považuje za jeden z významných faktorů v rozvoji metabolického syndromu.

5.2 SYSTÉMY HEPATOCYTŮ IN VITRO

Doby, kdy byly v experimentálních studiích využívány pouze metody *in vivo*, jsou dávno minulými. Nesporná výhoda *in vivo* metod je možnost sledování celkové patofyziologie toxického poškození určitého orgánu či tkáně s okolními vazbami na vzdálené orgánové systémy a se všemi jeho dopady na organismus. Poslední zmíněné je zároveň i velká nevýhoda, protože v celkovém biologickém systému je často nemožné postihnout jednotlivé kroky patofyziologického procesu. I z důvodů ekonomických, etických a legislativních jsou hledány a stále více používány alternativní postupy uskutečněné *in vitro*; děje se tak i s ohledem na to, že počet syntetizovaných látek, jejichž toxicitu je potřeba před zavedením do praxe či zařazení do klinického výzkumu otestovat, neustále narůstá [26]. Není tedy překvapením, že metody *in vitro* se stále více využívají i na poli testování hepatotoxicity chemických látek; jejich cytotoxického či genotoxického působení, definování toxických poškozujících mechanismů, nebo naopak při testech hepatoprotektivní kapacity látek. [50]

Všechny modelové systémy by měly splňovat jistá kritéria, aby bylo zaručeno, že s jejich pomocí získané výsledky budou relevantní, reprodukovatelné a co nejdříve extrapolovatelné na biologický systém, případně (a následně) přímo na člověka. Mezi hlavní z kritérií patří bezpečnost, stabilita systému, snadná manipulace se vzorky a dobrá dostupnost. Interpretaci a extrapolaci výsledků komplikují významné mezidruhové rozdíly, hlavně ve farmakokinetických parametrech, ať už jde o rozdíly ve fázi vstřebávání, distribuci, metabolismu (hlavně díky odlišné enzymové vybavenosti různých druhů) nebo eliminaci. Při extrapolaci výsledků je nutné mít na paměti, že neexistuje ideální model pro žádný z experimentálních studií prováděných na játrech *in vitro*. Vzájemné porovnávání výsledků napříč studiemi na různých pracovištích je dále komplikováno mnoha variantami a odchylkami v metodickém postupu, ať už jde o použitý zvířecí druh (nejčastěji se používají hlodavci), typ kultivace, použitá kultivační média apod.

Mnoho problémů s extrapolací by se odstranilo použitím lidských hepatocytů. Jejich využití brání poměrně obtížná dostupnost materiálu, nižší viabilita izolovaných buněk a také možné riziko přenosu infekčních onemocnění na personál. [26]

Jako *in vitro* modely lze použít izolovaná perfundovaná játra, jaterní řezy, izolované jaterní buňky – a to jako suspenzi, nebo jejich primární kultury – včetně kokultivací a speciálních 3D modelů; dále různé subcelulární frakce a buněčné linie. [50] Výhody a nevýhody hlavních modelových systémů hepatocytů *in vitro* jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Výhody a nevýhody vybraných modelových systémů *in vitro* [převzato 50, str. 512, upraveno podle 26]

Výhody	Nevýhody
Perfundovaná játra	
<ul style="list-style-type: none"> • Nejblíží podmínky k těm <i>in vivo</i> • Zachovaná cytoarchitektonika tkáně • Zachovaná mezibuněčná komunikace • Zachovaná funkce všech enzymů • Funkční žlučové kanálky • Možnost sběru žluče • Možnost sledování hemodynamických parametrů jaterní cirkulace • Možnost krátkodobých klinických studií 	<ul style="list-style-type: none"> • Krátkodobé přežívání (2-3 hod.) • Obtížná manipulace • Časová náročnost • Možnost studia 1 nebo jen několika málo sloučenin • Nemožnost použití lidských jater
Jaterní řezy	
<ul style="list-style-type: none"> • Částečně zachovaná cytoarchitektonika • Zachovaná funkce všech enzymů • Možnost studia na lidských játrech • Poměrně snadná a rychlá příprava vzorků • Možnost zhotovení histologických preparátů • Možnost skladování po kryokonzervaci 	<ul style="list-style-type: none"> • Životnost (6 hod. – 2 dny) • Nemožnost sběru žluče
Suspenze izolovaných hepatocytů	
<ul style="list-style-type: none"> • Funkce buněk blízká podmínkám <i>in vivo</i> • Možnost studií několika sloučenin v různých koncentracích 	<ul style="list-style-type: none"> • Životnost (2-4 hod.) • Chybění žlučových kanálků • Nemožnost mezibuněčných

<ul style="list-style-type: none"> • Získání materiálu i biopsií • Možnost mezidruhových studií • Snadná manipulace • Možnost kryokonzervace 	kontaktů
Primární kultury izolovaných hepatocytů	
<ul style="list-style-type: none"> • Funkčnost za určitých podmínek zachovaná i několik dní • Možnost studií indukce/inhibice enzymů • Možnost mezidruhových studií 	<ul style="list-style-type: none"> • Rychlé fenotypové změny • Poměrně rychlá ztráta aktivity biotransformačních enzymů • Změněné žlučové kanálky
Buněčné linie	
<ul style="list-style-type: none"> • Neomezený počet buněk • Zachování některých buněčných funkcí 	<ul style="list-style-type: none"> • Genotypová nestabilita • Snížení nebo až úplná ztráta enzymové aktivity
Subcelulární frakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Zachovaná enzymová aktivita • Bohaté na cytochromy P450 • Výhoda pro studium především biotransformačních enzymů 	<ul style="list-style-type: none"> • Krátkodobé studie • Nutné podání kofaktorů pro správnou funkci enzymů • Chybí cytosolická fáze enzymových reakcí
Geneticky modifikované buňky	
<ul style="list-style-type: none"> • Exprese 1 nebo více enzymů • Neomezený počet buněk 	<ul style="list-style-type: none"> • Použití pouze pro speciální účely • Nefyziologické hladiny enzymů

5.2.1.1 PRIMÁRNÍ KULTURY HEPATOCYTŮ

Primární kultury mají v oblasti experimentálního výzkumu velmi široké uplatnění. Jsou používány v mnoha oblastech od studia vlastního jaterního metabolismu, řízení a regulace jaterních funkcí, popisu a vzájemnému ovlivňování signálních drah přes faktory ovlivňující proliferaci hepatocytů až po mechanismy a účinky působení exogenních látek. V toxikologickém výzkumu hrají v současné době velmi významnou úlohu. Jsou prakticky nezastupitelné pro studium toxického účinku xenobiotik a jejich metabolismu v organismu, ale i ke zjišťování lékových interakcí nebo testování látek s potenciálními hepatoprotektivními účinky. [51]

Nejčastější formou používanou v kultivaci hepatocytů je klasický *monolayer*. Protože nezbytnou podmínkou udržení hepatocytů v diferencovaném stavu a zachování jejich specifických funkcí (např. enzymových aktivit) je kontakt a vzájemná interakce s okolními hepatocyty i s extracelulární matrix, jejíž hlavní součásti jsou kolagen, fibronektin, laminin a heparan sulfát [52], používají se ke kultivaci plastové nádoby potažené některou z těchto složek, nejčastěji kolagenem. Tím je docíleno obnovení polygonálního tvaru buněk, který při předešlém zpracování ztratily, a dalšího příznivého ovlivnění fungování buňky, např. zpomalení poklesu enzymové aktivity. Tento pokles lze také zbrzdit vhodnou suplementací kultivačního média, např. se přidává dimethylsulfoxid, nikotinamid, fenobarbital či valproát [26].

Nebylo by dnešního širokého využití této techniky bez existence metody izolace hepatocytů s vysokou výtěžností. V r. 1969 Berry a Friend zavedli do praxe dvoustupňovou kolagenázovou perfuzi jater, zatím bez použití vápenatých iontů. V r. 1976 Seglen jejich postup modifikoval a použil vápenaté ionty i kolagenázu. Obvykle se používá kolagenáza izolovaná z bakterií *Clostridium histolyticum* a jde o látku, která slouží k rozrušení extracelulární matrix. V prvním kroku dvoustupňové kolagenázové perfuze jsou pomocí roztoku, který neobsahuje Ca^{2+} , porušeny desmozomální spoje mezi jednotlivými hepatocyty. V dalším kroku dojde k dalšímu rozvolnění jaterní tkáně pomocí kolagenázy. Tato fáze naopak přítomnost Ca^{2+} vyžaduje, kvůli správnému fungování kolagenázy. (vlastní postup viz praktická část)

Nejčastějšími biochemickými vyšetřeními prováděných na primárních kulturách izolovaných hepatocytů jsou stanovení extracelulárních aktivit intracelulárních enzymů, hlavně LDH (laktátdehydrogenáza), méně často pak ALT (alaninaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza). Často se také stanovuje albumin a urea, protože tyto látky se jinde než v játrech nevytvářejí, nebo GSH (glutathion).

6 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit a popsat vliv liraglutidu (analogu GLP-1) na intaktní, nesteatotické a steatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro*, a to pomocí měření/sledování vybraných biochemických parametrů (aktivity LDH v kultivačním médiu, resp. LDH leakage, WST-1 test, produkce albuminu, MDA a ROS) za použití primárních kultur hepatocytů potkana.

Dále jsme hodnotili, zda vykazuje LIRA hepatoprotektivní účinek na hepatocyty potkana v primární kultuře poškozené acetaminofenem.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Pokusná zvířata

Pro potřeby pokusů byli vybráni samci dospělých potkanů kmene Wistar o počáteční hmotnosti 180 – 240 g. Byli chováni po dobu 6 týdnů za standardních podmínek při konstantní teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti vzduchu $55 \pm 10\%$, výměně vzduchu 12-14x za hodinu a při 12 hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Zvířata měla po celou dobu volný přístup k vodě a potravě; byla ustájena v klecích po 6 – 10 jedincích. Kontrolní, nesteatotičtí potkaní byli krmeni standardní peletovanou stravou (*ST-1, Velaz, Praha, ČR*) – 10% energie z tuků, 30% energie z proteinů, 60% energie sacharidového původu. [18] Potkanům určených pro izolaci steatotických hepatocytů byla podávána vysokotuková strava o složení 71% energie z tuků, 18% energie z bílkovin a 11% energie ze sacharidů (přesné složení viz. [53]).

7.2 Složení roztoků

Roztok A: 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,1206 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g KH_2PO_4 ; 2,188 g NaHCO_3 ; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min. synceno karbogenem (95 % O_2 + 5 % CO_2), aby výsledné pH bylo 7,3 – 7,4. Roztok A je na jednu izolaci třeba 250 ml.

Roztok B: 4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,07236 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,036 g KH_2PO_4 ; 0,3528 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,314 g NaHCO_3 ; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. synceno karbogenem (95 % O_2 + 5 % CO_2), aby výsledné bylo pH 7,3 – 7,4; obvykle používáme 200 mg surové kolagenázy² do 200 ml recirkulačního roztoku. Pro izolaci je potřeba 200 ml roztoku B.

Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium): 6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,13 g KH_2PO_4 ; 0,374 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2g NaHCO_3 ; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou *aqua pro injectione*. Pro práci s izolovanými kulturami byl do roztoku C přidán albumin (1,333 g do 100 ml).

² Množství použité kolagenázy se liší se u každé šarže, neboť její aktivita není stejná, proto je nutno pro novou šarži kolagenázy vždy vytitrovat ideální dávku.

Kompletní Williamsovo E médium: Williamsovo E médium bez L-glutaminu a fenolčerveně (*Biotech*) s přidáním fetálního bovinního sérum (6%, *Biotech*), L-glutaminem (2mM, *Biotech*), penicilinem (200 IU/ml, *Biotech*), streptomycinem (0,2 mg/ml, *Biotech*), inzulinem (0,08 IU/ml, *Actrapid HM inj, Novo Nordisk*), prednizolonem (0,5 µg/ml, *Solu-Decotin, Merck*) a glukagonem (0,008 µg/ml, Glukagen 1 mg inj. *HYPOKIT, Novo Nordisk*).

Kompletní Williamsovo E médium bez FBS: kompletní Williamsovo E médium bez fetálního bovinního séra.

7.3 Dvoustupňová kolagenázová perfuze jater

Potkan je před vlastní jaterní izolací v exikátoru v digestoři uveden do etherové narkózy. Poté je fixován na operačním stolku. Po dezinfekci kůže v dané oblasti je tzv. „V-stříhem“ otevřena dutina břišní. Do *v. cava inferior* je aplikován heparin ve fyziologickém roztoku (200 m. j. na 100 g hmoty potkana). Do *v. portae* je zavedena kanyla, která je napojena na perfuzní aparaturu s perfuzním roztokem temperovaným na 37 °C a nasyceným karbogenem (směs 95% O₂ a 5% CO₂).

Nejprve je provedena perfúze *in situ* tzv. roztokem A – roztokem bez obsahu Ca²⁺ (přesné složení str. 43). Při úspěšné perfúzi se játra rychle a homogenně odbarví a postupně dochází ke zvětšování jejich objemu. Aby nedošlo k mechanickému poškození jater tlakem, je nutné po chvíli prostříhnout *v. cava inferior*. Ihned poté musí dojít k co nejrychlejšímu vyjmutí jater z dutiny břišní, jejich oplachu v kádince s fyziologickým roztokem a dále proplachujeme roztokem A.

Izolace pokračuje recirkulační perfúzí jater roztokem B - s obsahem kolagenázy (*Collagenasa Cruda, Serva Electrophoresis*) a Ca²⁺ - po dobu 14 minut. Po ukončení této perfúze jsou játra ponořena do roztoku C – tzn. do Krebs-Henseleitova média s bovinním sérovým albuminem, který je důležitý pro zachování správných koloidně-osmotických podmínek. Jaterní tkáň je mechanicky rozvolněna o stěnu kádinky, získaná suspenze buněk je přefiltrována přes sterilní 4 vrstvy gázy do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 5 min. při 28g (500 otáček/min) při 4 °C (*centrifuga Rotina 380R, Hettich Zentrifugen*). Po odsátí supernatantu jsou buňky resuspendovány znovu v roztoku C a opět centrifugovány za stejných podmínek. Celý postup je pak ještě jednou opakován. Celkově se tedy centrifuguje 3x. Zkumavka s izolovanými buňkami

by měla být po celou dobu, kromě co nejrychlejšího manipulování při odběru buněk ke kultivaci, uchovávána na ledu.

7.4 Stanovení viability izolovaných hepatocytů

Viabilita hepatocytů musí být stanovena bezprostředně po jejich izolaci. K jejímu zjištění se využívá trypanové modři (sodné soli kyseliny toluidin-diazodiamino-naftol-disulfonové), která je schopna prostupu přes plazmatickou membránu do buňky. Pokud jde o buňku s neporušenou plazmatickou membránou, je barvivo z buňky vypuzeno, zatímco v případě poškozených buněk dochází k jeho zadržování v buňce. 10 μ l suspenze hepatocytů o koncentraci přibližně 10^6 buněk v 1 ml je smícháno na podložním sklíčku s 10 μ l 0,4% trypanové modři (*Tryptan blue*, Sigma-Aldrich). Po přikrytí krycím sklíčkem se za použití světelného mikroskopu počítají neobarvené živé a modré mrtvé buňky. Počítání by mělo být provedeno při zvětšení 200x alespoň v deseti různých polích a v každém poli by mělo být nejméně 10-15 buněk kvůli dostatečně velkému vzorku k omezení statistických chyb. Vzhledem k cytotoxicitě trypanové modři a kvůli tvorbě tzv. *blebs* (cytoplazmatických výběžků) při kontaktu hepatocytů se sklem by mělo být hodnocení provedeno co nejrychleji. Výsledek se uvádí jako procentuální poměr počtu živých buněk k celkovému počtu hodnocených buněk. Hodnota viability se pohybuje většinou nad 90%, její limitní hodnota pro použití buněk je 85%.

7.5 Stanovení denzity buněk

Denzita buněk se určuje v Bürkerově komůrce a znát její hodnotu je nutné pro potřeby následné kultivace. Komůrka je naplněna suspenzí buněk získaných izolací, 100x naředěných (10 μ l pečlivě resuspendovaných buněk z izolace se napipetuje do zkumavky s 990 μ l Krebs-Henseleitova média a řádně promíchává po dobu jedné minuty). Počítá se v 50 velkých čtvercích (25 na každé straně komůrky) (vzorec 1). Denzita může být zjištěna i pomocí přístroje na počítání buněk (*Cellometer Auto T4*, *Nexcelom Bioscience*). K měření vzorků slouží jednorázové komůrky o objemu 20 μ l. Jeho výhodou je vyšší počet hodnocených buněk, tím pádem menší zatížení výsledků statistickou chybou. Před měřením je možné nastavit parametry pro počítání, některé buňky lze začlenit do analýzy a některé naopak vyloučit. Přístroj je schopen spočítat

i viabilitu buněk. Nevýhodou je, jako u všech automatizovaných postupů podobného typu, jistá míra nejistoty, zda přístroj rozeznává buňky podle zvolených paramentů správně.

Vzorec 1: Vzorec pro výpočet denzity buněk při použití Bürkerovy komůrky

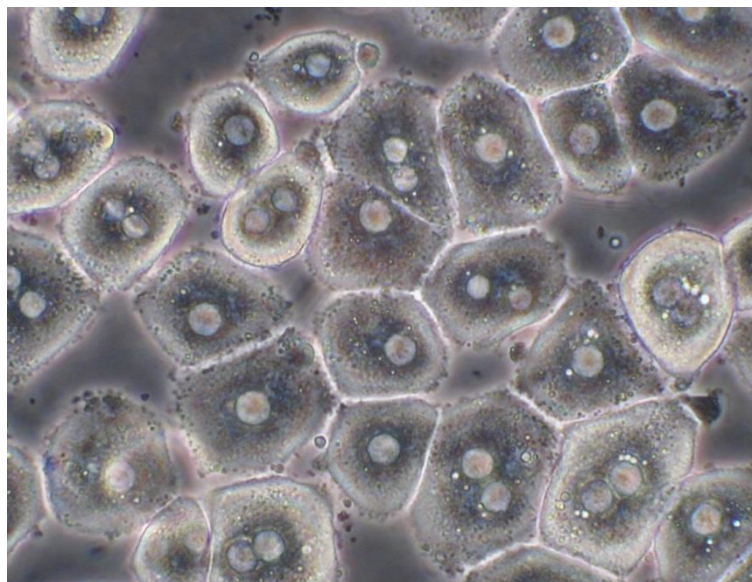
součet buněk v 50 polích

$$\text{denzita [bb./ml]} = \frac{\text{-----}}{50 \text{ (počet polí)}} \times 250 \text{ (přepočet na } 1\text{mm}^3) \times 100 \text{ (ředění)} \times 1000 \text{ (přepočet na ml)}$$

7.6 Morfologické hodnocení buněk

Z důvodů posuzování neobarvených buněk je vhodné použití fázové kontrastní mikroskopie, konkrétně invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem *Olympus IX51*. Digitální fotografie byly pořízeny pomocí fotoaparátu *Olympus E-600*.

Obr. 15: Vzhled hepatocytů za 2 hodiny po nasazení na kolagenované Petriho misce (fázový kontrast, zvětšení 200x). [26, str. 56]



7.7 Primární kultury hepatocytů potkana

Ke kultivaci hepatocytů se používají sterilní Petriho misky o průměru 60 mm pro buněčné kultury, respektive 6, 12 a 96 jamkové plastové destičky (*NUNC – Immuno Plate*). Všechny úkony spojené s kultivací probíhají za sterilních podmínek v laminárním boxu. Před vlastní kultivací musí být Petriho misky nakolagenovány. Ke kolagenaci se používá kolagen typu I (*Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich*). Kvůli jeho špatné rozpustnosti se musí rozpouštět v 20 mM kyselině octové (2 mg kolagenu do 6,66 ml 20 mM kyseliny octové). Napipetovaný roztok necháme 10 min. v kontaktu s plastem, poté ho opět odstraníme. Nakolagenovanou destičku je nutné zneutralizovat roztokem C, nebo Williamsovým E médium (složení roztoků str. 44).

Buňky naředíme na denzitu 1 milion buněk v 1 ml kompletního Williamsova média. Na Petriho misky nanášíme 2 ml této suspenze, výsledná denzita na jedné misce je tedy 2 milióny hepatocytů. Podle metody a protokolu pokusu si připravíme vhodný počet a druh destiček ke kultivaci. Využívá se 96-jamkových mikrotitračních destiček (*C 96 Maxisorp, NUNC – Immuno Plate*), do nich pipetujeme objem 100 µl (33 tisíc buněk/jamku), do 12 jamkových (*well plate 12, NUNC – Immuno Plate*) pipetujeme objem 0,5 ml (½ milionu buněk/jamku) a do 6 jamkových destiček (*well plate 6, NUNC – Immuno Plate*) pipetujeme 1 ml (1 milion buněk na jamku). Při nasazování buněk (tzv. *seeding*) dbáme na dostatečné promíchávání suspenze hepatocytů, protože mají tendenci rychle se usazovat na dně nádoby. Destičky vložíme na 2 hodiny do CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C). Po uplynutí této doby odsajeme nepřichycené buňky a přidáme médium s testovanými látkami. Po celou dobu práce s primárními kulturami destičky nesmí vyschnout.

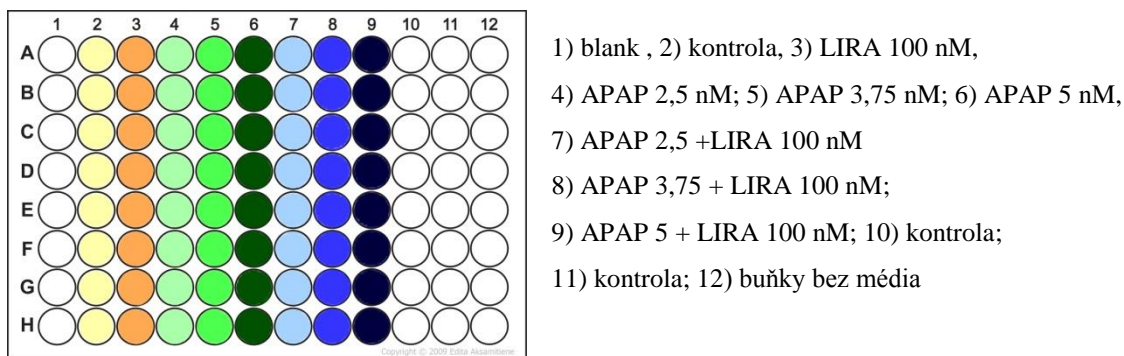
Do Petriho misek s kontrolními skupinami dáváme kompletní Williamsovo E médium, do ostatních stejné médium bohatší o testovanou látku a inkubujeme je po stanovenou dobu při 37 °C v 5% CO₂. Poté odebereme médium, které je využito k biochemickým vyšetřením, a/nebo se k dalšímu stanovení využijí přichycené hepatocyty.

7.8 Liraglutid – design experimentu

V experimentu byly využity dva typy hepatocytů potkana: nesteatotické (ST-1) a steatotické (HF). Denzita nasazených buněk byla 330 000 bb/ml u obou typů hepatocytů. V každé jamce 96 WP destičky, kam jsme pipetovali po 100 μ l buněčné suspenze, byla tedy hustota 33 000 bb/jamku. Podrobnosti viz. str. 47 primární kultury hepatocytů. Po inkubaci byla destička vyklepnuta a k buňkám byl přidán LIRA o koncentracích 1, 10 a 100 nM (příp. 0,1 a 1000 nM u WST-1 a DCFDA testů). Zásobní roztok LIRA (266,58 μ M) byl ředěn na potřebnou koncentraci kompletním WE médiem bez FBS. Do každé jamky bylo pipetováno po 100 μ l požadované koncentrace LIRA. Jako kontroly ST-1_K i HF_K sloužilo kompletní WE médium bez FBS. Destičky se vzorky byly inkubovány 24 hodin (5% CO₂, 37 °C). U každého měřeného biochemického parametru bylo provedeno v rámci jednoho pokusu 6 měření. Ke spektrofotometrickým měřením byl použit přístroj Tecan (*Tecan Infinite M200*).

V případě pokusu na hepatoprotektivní účinky LIRA na hepatocyty poškozené APAP byl po inkubaci a vyklepnutí destičky přidán APAP o příslušné koncentraci (2,5; 3,75 a 5 nmol/l), spolu s LIRA o koncentraci 100 nmol/l. Schéma pokusu obr. 16.

Obr. 16 : Schéma pokusu LIRA+APAP – rozložení na destičce



7.8.1 Statistické vyhodnocení

Výsledky měření byly zpracovány v programu Excel (Microsoft office) a statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad. Testování proběhlo na hladině významnosti $\alpha \leq 0,05$. Ke statistickému zhodnocení byla použita one-way ANOVA. V případě normálního rozložení dat byl proveden post hoc Tukey's test. V případě, že

data neprošla testem normality, použili jsme neparametrický Kruskal-Wallisův test a jako post hoc test test Dunnettův.

7.9 Biochemické testy

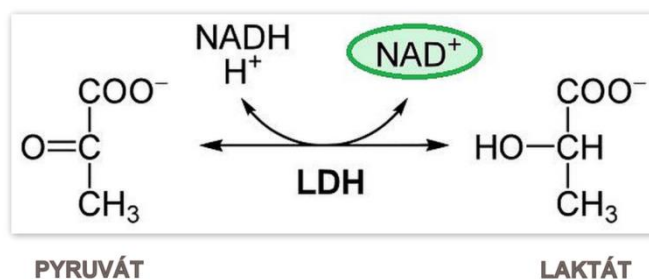
7.9.1 Stanovení LDH

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytosolický enzym katalyzující vzájemnou přeměnu pyruvátu na laktát (obr. 17), přičemž směr reakce závisí na koncentracích substrátů. Uvolňuje se z poškozených hepatocytů a na rozdíl od klinického hodnocení jde o poměrně citlivý ukazatel membránového poškození buněk. Lze stanovovat hodnotu extracelulární aktivity LDH i její celkovou aktivitu. K určení celkové aktivity je třeba znát i hodnotu aktivity intracelulární LDH, takže pro její určení je nutno buňky zlyzovat, např. zmražením na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následným přidavkem ledové deionizované vody. Vhodnějším vyjádřením aktivity LDH je LDH-L (*LDH leakage*), což je podíl extracelulární a celkové aktivity LDH. Udává se v % a vyjadřuje, kolik intracelulární LDH uniklo z buněk v extracelulárním prostoru. Jde o přesnější vyjádření než vnější aktivita, protože jeho hodnota je méně ovlivňována nestejným počtem buněk v jamce.

Principem testu je spektrofotometrické změření nárůstu koncentrace NADH.

Ke stanovení extracelulárního LDH (LDH-EC) do 96 jamek pipetujeme po $10\text{ }\mu\text{l}$ vzorku, přidáme $250\text{ }\mu\text{l}$ LDH činidla temperovaného (aby se předešlo teplotnímu šoku) pomocí termobloku na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a naředěného pomocí WE média v poměru 1:4. Pro stanovení použijeme LDH kalibrátor o enzymové aktivitě 416 IU (*DiaSys*). Každou minutu měříme pomocí spektrofotometru změnu absorbance v čase, a to po dobu 5 minut. Pro stanovení intracelulárního LDH se obsah destičky vyklepne a do každé jamky je pipetováno po $100\text{ }\mu\text{l}$ deionizované vody s následnou 1,5 hod. inkubací. Další postup je shodný se stanovením LDH-EC.

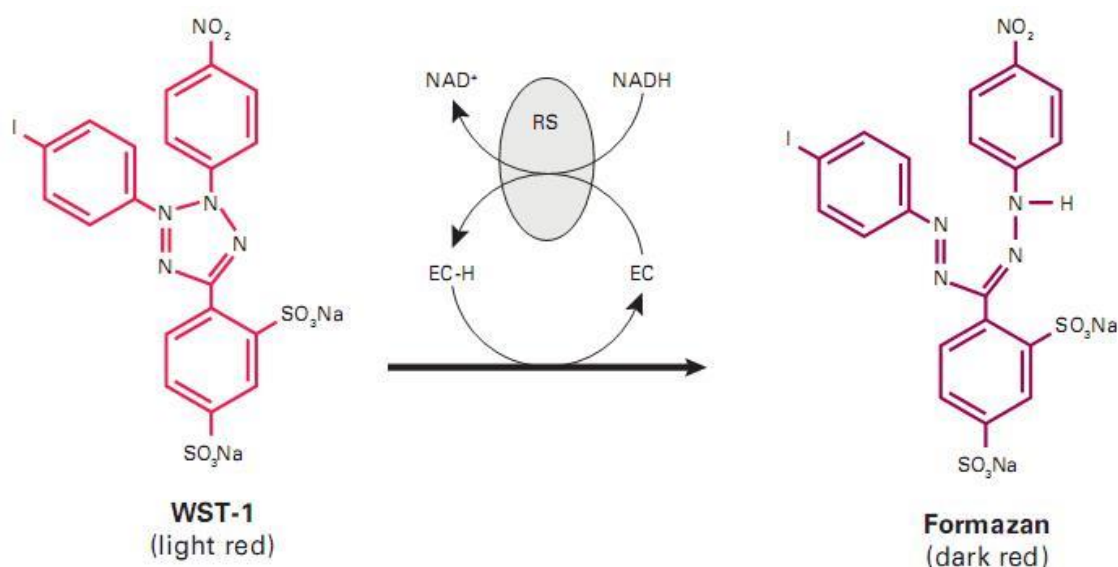
Obr. 17: Schéma rce katalyzované enzymem LDH



7.9.2 WST-1 test

WST-1 (4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát) činidlo se používá pro stanovení viability buněk, ke zjištění stupně buněčné proliferace nebo k potvrzení cytotoxicity endogenních i exogenních látek. Principem testu je redukce činidla, které jsou schopné jen viabilní buňky, na barevné formazany (obr. 18). Nárůst koncentrace formazanů je úměrný metabolické aktivitě buněk a projeví se jako nárůst absorbance, která je změřena spektrofotometricky. Výhodou testu je jeho velmi dobrá citlivost a to, že nevyžaduje převádění buněk z místa na místo; že celé stanovení probíhá na jedné destičce. Nevýhodou je to, že počáteční fáze apoptózy se nevyznačuje snížením metabolických funkcí, ale naopak dochází ke zvýšení metabolické aktivity. K jeho redukci může docházet i v přítomnosti superoxidu.

Obr. 18 : Přeměna WST-1 činidla na formazan



(<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Cytotox.html>, 4. 5. 2014)

Přípravenou (postup viz výše) 96 WP destičku s primární kulturou vyklepneme, přidáme 100 μl Williamsova E média pro proplach, vyklepneme. Postup opakujeme ještě jednou a poté napipetujeme do každé jamky 100 μl reakčního činidla WST-1 (*Cell proliferation reagent, Roche*), které před použitím zředíme kompletním Williamsovým E médiem v poměru 1:10. Měříme absorbanci při vlnové délce 440 nm v čase 0, po 1 a po 2 hod. Mezitím destičku umístíme do inkubátoru (37 °C, 5% CO_2).

7.9.3 Stanovení albuminu

Stanovení albuminu je specifické hodnocení funkční kapacity hepatocytů, protože albumin je tvořen výhradně játry. Při testu se využívá metody ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), což je imunoenzymatická metoda využívající reakce protilátek proti albuminu. Jde o metodu velmi specifickou a citlivou, avšak cenově náročnou. Ke kvantifikaci albuminu jsme použili komerční kit (*Rat Albumin ELISA Quantification Kit, BETHYL*). Do každé jamky mikrotitrační destičky (*C 96 Maxisorp, NUNC – Immuno Plate*) pipetujeme po 100 μ l naředěných (1:100, ředěno uhličitano-hydrogenuhlíčanovým pufrům) ovčích protilátek proti potkanímu albuminu. Po dobu 60 min. necháme protilátky inkubovat při teplotě 20-25 °C. Tato doba je nezbytná k jejich přisednutí. Poté jamky 3x promyjeme promývacím roztokem (složení roztoků viz. dále). V dalším kroku přidáme 200 μ l blokovacího roztoku, který znemožní navázání protilátek na stěnu destiček v dalším průběhu stanovení; necháme působit 30 min. (opět při laboratorní teplotě), poté opět 3x promyjeme. Přidáme 10 μ l naředěných vzorků a standardů a inkubujeme 60 min. za stejných podmínek; poté promyjeme 5x promývacím roztokem.

Použijeme kalibrační křivku s ředěním standardu 500; 250; 125; 62,5; 31,25 a 15,625 ng albuminu/ml.

Do každé jamky přidáme 100 μ l protilátky (ředění 1:30000) značené křenovou peroxidázou. Následuje 60 min. inkubace, poté přidáme 100 μ l substrátového roztoku do každé jamky, inkubujeme 25 min. Po této době reakci zastavíme 100 μ l 2M H_2SO_4 . Změříme absorbanci vzniklého barevného produktu při vlnové délce 450 nm (*Tecan infinite 200*). Jako slepý roztok slouží ředící roztok. Výsledky vyhodnocujeme v programu *Magellan Standard V 4.00*.

Složení roztoků používaných při metodě ELISA stanovení albuminu

- 0,05 M uhličitano-hydrogenuhlíčanový pufr
16 ml 0,2 M Na_2CO_3 + 34 ml 0,2 M $NaHCO_3$ + doplnit destilovanou vodou na celkový objem 200 ml, výsledné pH 9,6.
- 50 mM TRIS (ve fyziologickém roztoku)
50 ml 0,1 M TRIS (*TRIZMA[®] Base, Sigma-Aldrich*) s 0,9 g NaCl titrujeme 0,1M HCl do pH 8 a doplníme destilovanou vodou do celk. objemu 100 ml.
- Blokovací roztok

50 mM Tris ve fyziologickém roztoku, 1% BSA (*Sigma-Aldrich*), pH 8,0.

- Promývací roztok

50 mM Tris ve fyziologickém roztoku, 0,05% *Tween 20* (*Sigma-Aldrich*), pH 8,0.

- Ředící roztok

50 mM Tris ve fyziologickém roztoku, 0,05% *Tween 20*, 1 % BSA (*Sigma-Aldrich*), pH 8,0.

- Substrátový roztok

10 mg TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin, *Sigma-Aldrich*) rozpustíme v 1 ml dimethylsulfoxidu (*Sigma-Aldrich*) a citrát-acetátovým pufrům (0,1 M octan sodný a 0,1 M kyselina citrónová) titrujeme do pH 6,0; v poměru 1:100 přidáme peroxid vodíku (50 μ l 30% H_2O_2 na 100 ml substrátového roztoku).

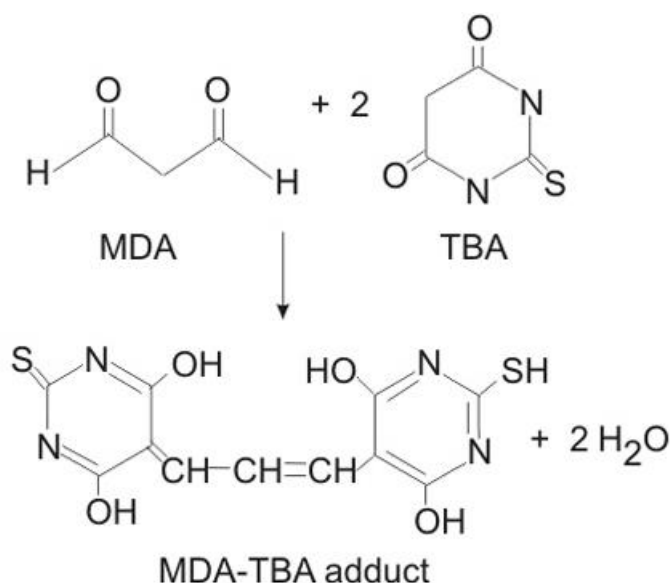
- Zastavovací roztok

2 M H_2SO_4

7.9.4 Stanovení MDA

Malondialdehyd (MDA) je co by konečný produkt lipoperoxidace používán jako marker peroxidace membránových lipidů, která je způsobena reaktivními formami kyslíku nebo lipoxygenázami. Nejčastěji se stanovuje reakcí s TBA (thiobarbiturátem). Vzniklý barevný komplex (obr. 19) se stanovuje spektrofotometricky. Jde o rychlý a jednoduchý test, ale s nízkou specifitou. TBA totiž reaguje s různými sloučeninami, např. s bilirubinem a prostaglandiny, které interferují při spektrofotometrickém stanovení.

Obr. 19: Princip stanovení malondialdehydu pomocí thiobarbiturátu (TBA) [54]

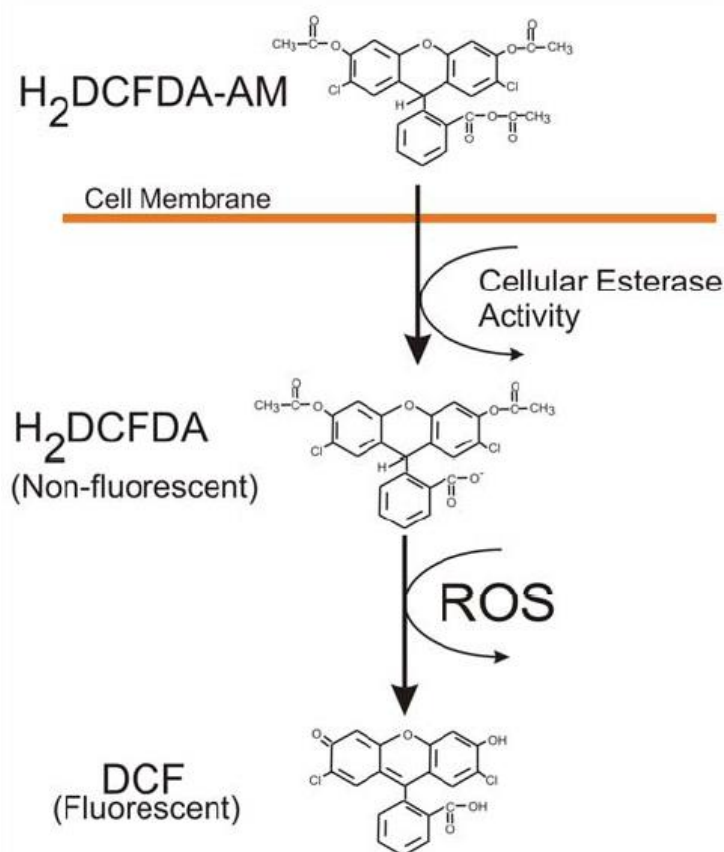


Odebereme 1 ml média z buněčné kultury a napipetujeme do zkumavky, přidáme 1 ml reakčního činidla (vodný roztok 15% TCA; 0,37% TBA a 0,25% HCl). Směs promícháme na třepačce a na 15 min. umístíme do termobloku temperovaného na 100 °C. Po této době necháme směs vychladnout na laboratorní teplotu a zcentrifugujeme (1000g, 20 min.). Pomocí spektrofotometru změříme absorbanci při vlnové délce 535 nm oproti slepému vzorku, což je 1 ml destilované vody s 1 ml reakčního činidla inkubovaných za stejných podmínek jako vzorky.

7.9.5 DCFDA test

DCFDA (2',7' –dichlorofluorescein diacetát) je fluorescenční činidlo, které se používá k měření oxidačního stresu v buňkách, tzn. tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Jako lipofilní, nefluoreskující látka proniká přes plazmatickou membránu do nitra buňky, kde je pomocí nitrobuněčných esteráz deacetylována na dihydro dichlorofluorescein diacetát (H₂DCFDA). Ten pak může být (a za což jsou obvykle zodpovědné ROS) oxidován na DCF (2', 7'- dichlorofluorescein), který vykazuje fluorescenční aktivitu (obr. 20).

Obr. 20: Schéma přeměny nefluoreskujícího DCFDA na fluoreskující DCF [6]



K testu je nutné připravit nejdříve zásobní roztok DCFDA a to tak, že k originálnímu balení 50 μg DCFDA (*InVitrogen C6827 CM-H2DCFDA*; $M_r = 577,8$; 20 x 50 μg) přidáme 86,5 μl DMSO (dimethylsulfoxid). Poté vezmeme 10 μl zásobního DCFDA a přidáme ho k 9,99 ml kompletního Williamsova E média bez FBS. Finální ředění je tedy 1 μM DCFDA (0,1 % DMSO). Vzhledem k citlivosti látky na světlo, chráníme nádobku, která ji obsahuje, alobalem.

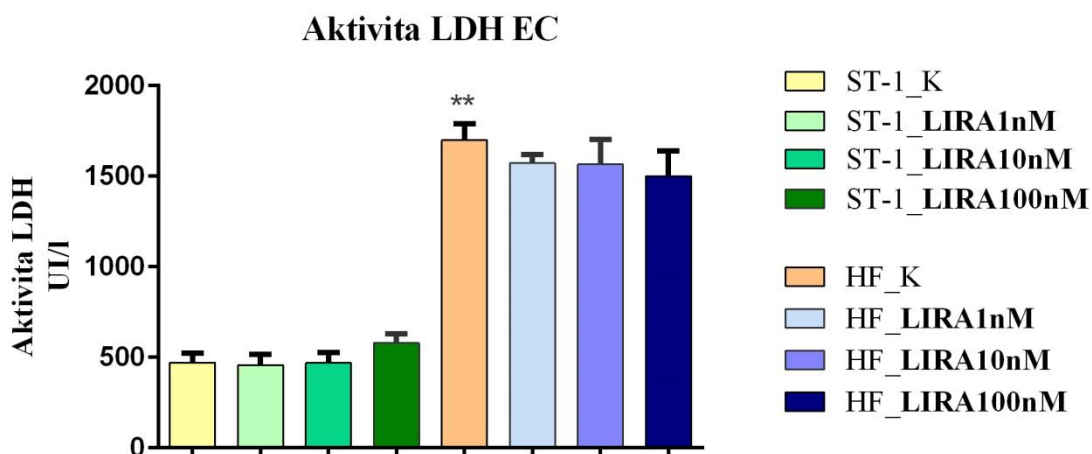
8 VÝSLEDKY

8.1 Výsledky biochemických pokusů

8.1.1 Vliv LIRA na aktivitu LDH v kultivačním médiu hepatocytů potkana

Použity byly intaktní ST-1 a HF primární kultury hepatocytů po 24 hodinovém působení LIRA (liraglutidu) o koncentracích 1, 10 a 100 nmol/l. Viabilita intaktních, neztukovatělých, hepatocytů byla na začátku experimentu 95 %, steatotických 94 %. Extracelulární aktivita LDH (LDH-EC) nevedla v žádné z uvedených koncentrací LIRA ke statisticky významnému nárůstu aktivity LDH oproti příslušným kontrolám (graf 1).

Graf 1: *Vliv LIRA na aktivitu LDH-EC v médiu po 24 hodinové inkubaci* (n = 6, ** p < 0,01 HF_K vs ST_K)



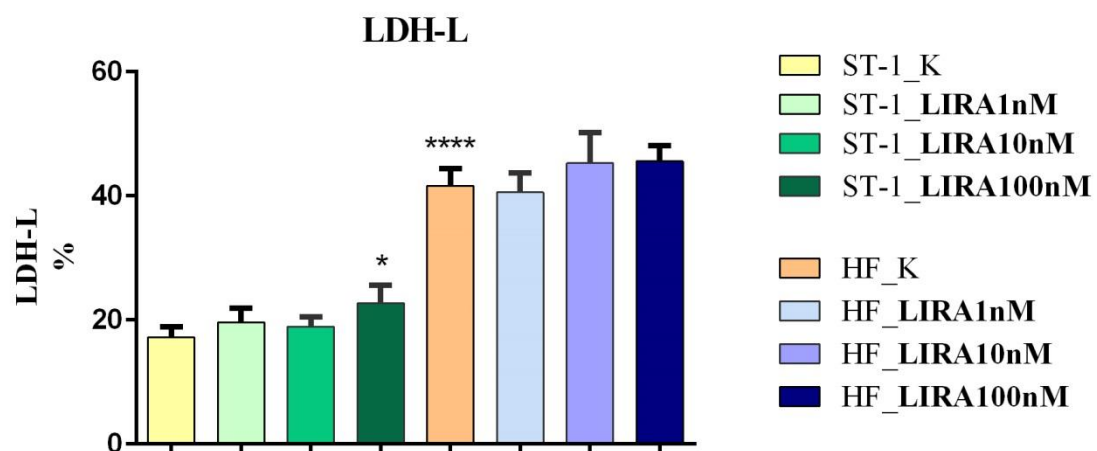
Při hodnocení působení LIRA na LDH leakage bylo nutné rovněž změřit intracelulární aktivitu LDH (LDH-IC).

Při statistickém zpracování parametry LDH-EC i LDH-L splňovaly normální rozdělení, proto bylo k dalšímu testování využito one-way ANOVA a Tukey's testu. K signifikantnímu zvýšení LDH-L došlo po 24h inkubaci neztukovatělých hepatocytů se 100 nM LIRA oproti kontrole. U ostatních koncentrací LIRA signifikantní nárůst LDH-L zaznamenán nebyl.

V porovnání hepatocytů ST-1 a HF převyšoval LDH-L u HF zhruba dvojnásobně LDH-L u ST-1 (p < 0,0001).

Graf 2: Vliv LIRA na LDH-L po 24 hodinové inkubaci (n = 6, * p < 0,05

ST-1_LIRA100nM, **** p < 0,0001 HF_K vs ST-1_K)



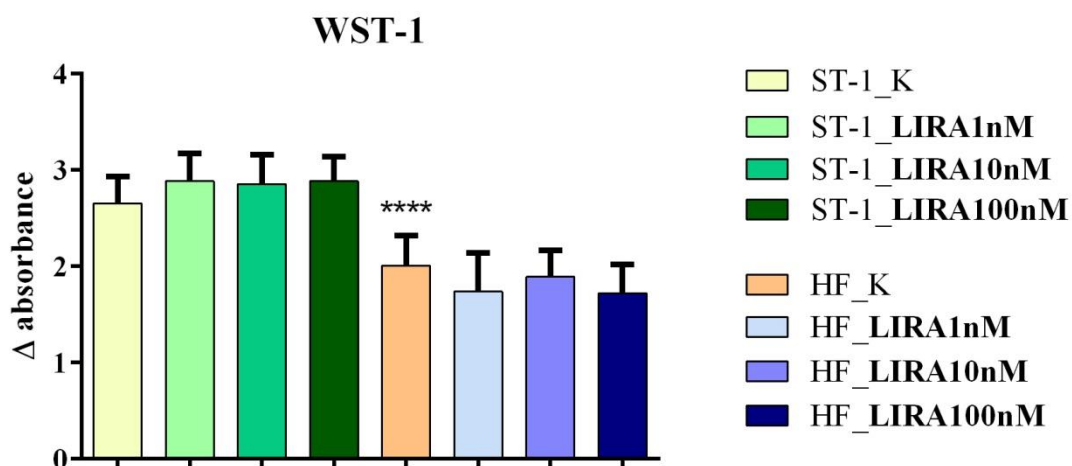
8.1.2 Vliv LIRA na viabilitu hepatocytů (WST-1 test)

Námi použité koncentrace LIRA 1, 10 a 100 nmol/l nevykazovaly signifikantní vliv na aktivitu celulárních dehydrogenáz (graf 3). Ke statisticky významné aktivitě celulárních dehydrogenáz nedošlo ani v koncentracích 0,1 nM a 1000 nM LIRA (nebyly pro větší přehlednost do grafu zařazeny). Výchozí viabilita intaktních, neztukovatělých (ST-1) hepatocytů byla 89 %, steatotických 88 %.

Napříč skupinami ST-1 a HF hepatocytů bylo zaznamenáno signifikantní snížení metabolické aktivity u HF hepatocytů oproti ST-1.

Data vykazovala normální rozdělení.

Graf 3: Vliv LIRA na aktivitu celulárních dehydrogenáz po 24 hodinové inkubaci (WST-1 test) (n = 6; **** p < 0,0001; ST-1_K vs HF_K)



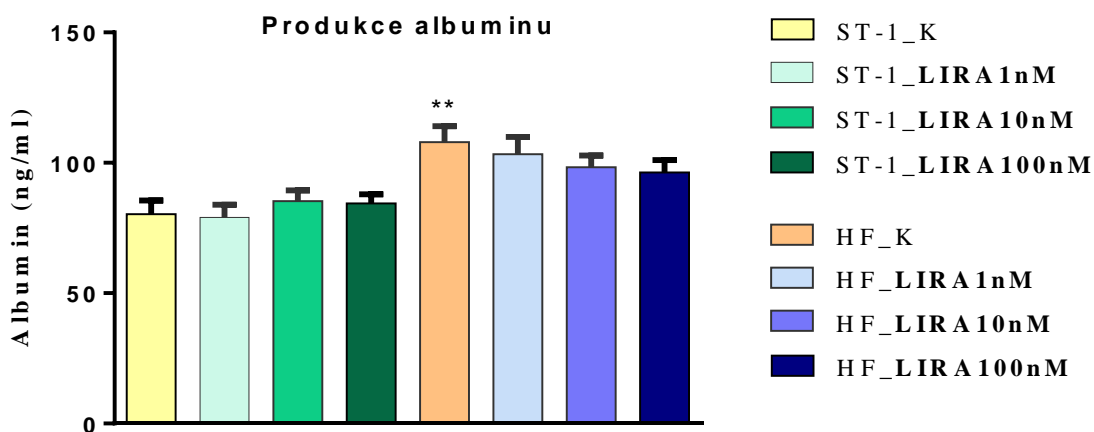
8.1.3 Vliv LIRA na syntézu albuminu v hepatocytech

Po 24 hodinové inkubaci hepatocytů s LIRA o koncentracích 1, 10 a 100 nmol/l nedošlo v hepatocytech k signifikantní změně syntézy albuminu vůči příslušným kontrolám (graf 4). Viabilita po izolaci intaktních, nesteatotických hepatocytů byla 89%, steatotických 88%. U HF_K hepatocytů byl zaznamenán signifikantní nárůst produkce albuminu oproti ST-1_K.

Data nevykazovala normální rozdělení.

Graf 4: Vliv LIRA na syntézu albuminu v hepatocytech po 24 hodinové inkubaci

(n = 6, ** p < 0,01; ST-1_K vs HF_K)



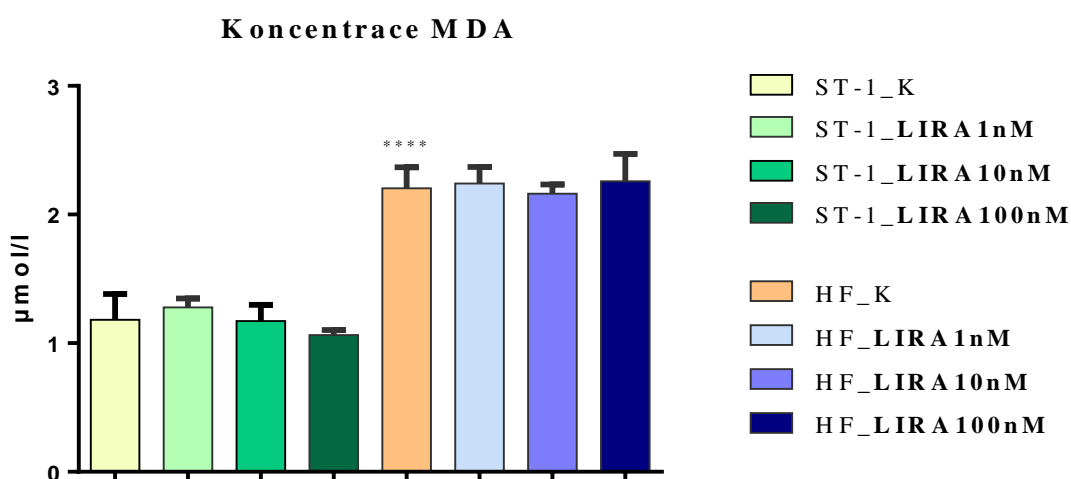
8.1.4 Vliv LIRA na produkci MDA v hepatocytech potkana

Použité koncentrace LIRA 1, 10 a 100 nmol/l nevedly k signifikantním změnám v koncentraci MDA v kultivačním médiu u obou skupin hepatocytů (ST-1 ani HF) vzhledem k příslušným kontrolám (graf. 5). Výchozí viabilita hodnocených buněk byla 95 % pro ST-1 hepatocyty a 94 % pro HF hepatocyty.

V médiu kontrolních HF hepatocytů byla zjištěna zhruba dvojnásobně vyšší koncentraci MDA než u hepatocytů ST-1.

Data vykazovala normální rozdělení.

Graf 5: Vliv LIRA na produkci MDA v hepatocytech po 24 hodinové inkubaci (n = 6, **** $p < 0,0001$; HF_K vs ST-1_K)

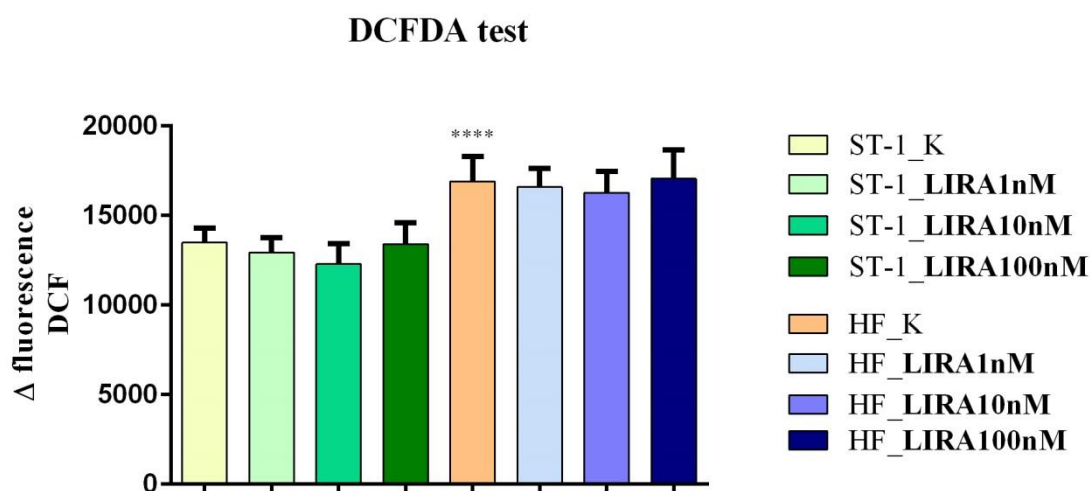


8.1.5 Vliv LIRA na produkci ROS (DCFDA test)

Koncentrace LIRA 1, 10 a 100 nmol/l nevedly k signifikantním změnám v produkci ROS vzhledem k příslušným kontrolám po 24 hodinové inkubaci (graf. 6). Viabilita izolovaných hepatocytů byla 94 % u intaktních, nesteatotických a 95 % u steatotických hepatocytů. U HF_K byly zaznamenány signifikantně vyšší koncentrace ROS než u ST-1_K.

Data vykazovala normální rozdělení.

Graf 6: Vliv LIRA na produkci ROS po 24 hodinové inkubaci (DCFDA test) (n = 6, **** p < 0,0001; ST-1_K vs HF_K)

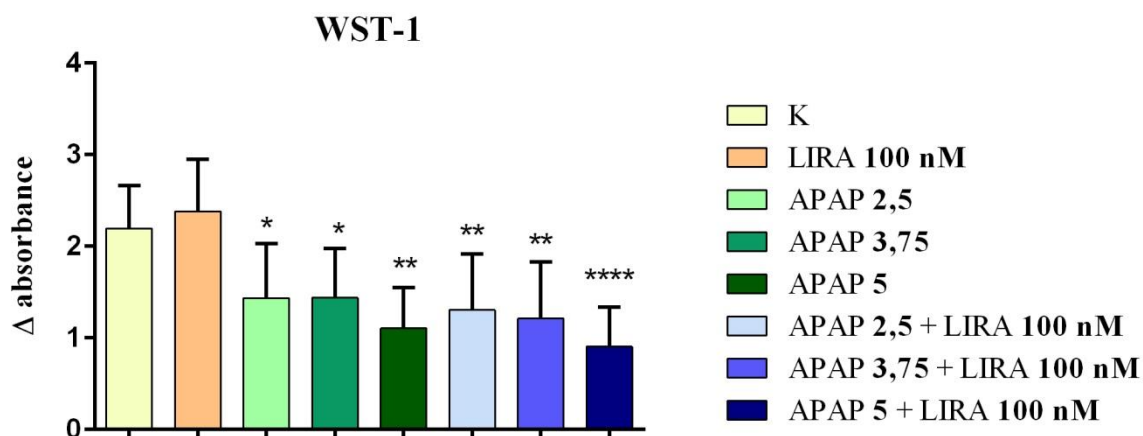


8.1.6 Vliv LIRA na viabilitu hepatocytů poškozených APAP

Koinkubace hepatocytů s LIRA o koncentraci 100 nmol/l a 2,5; 3,75 resp. 5 mM APAP po dobu 20 hod. nevedla k signifikantním změnám ve viabilitě hepatocytů oproti inkubaci se samotným APAP (graf. 7). Viabilita izolovaných hepatocytů použitých pro experiment byla 88%.

Data nevykazovala normální rozdělení.

Graf. 7: Vliv LIRA o koncentraci 100 nmol/l na viabilitu hepatocytů poškozených APAP o koncentracích 2,5; 3,75 a 5 mmol/l po 20 hod. inkubaci (n = 6, APAP+LIRA vs APAP)

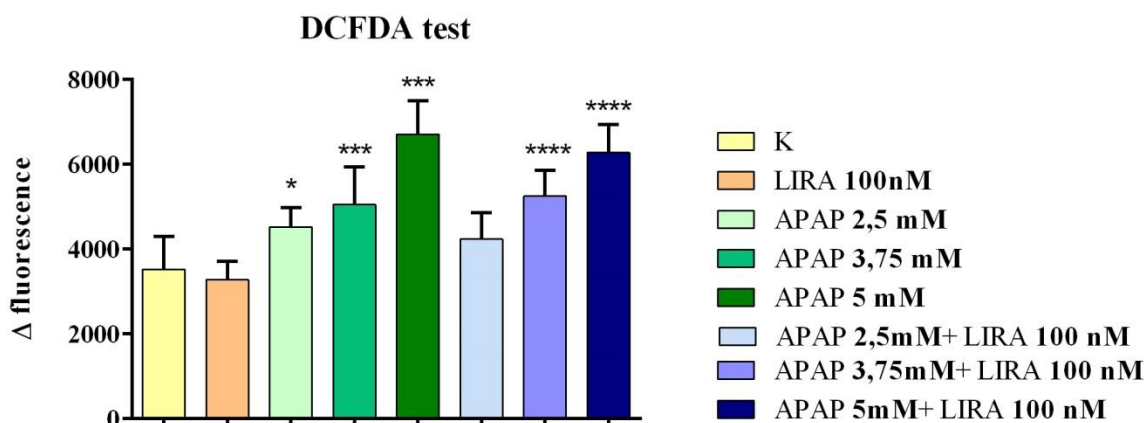


8.1.7 Vliv LIRA na produkci ROS v hepatocytech inkubovaných s APAP

Koinkubace 100 nM LIRA a 2,5; 3,75 resp. 5 mM APAP nevedla po 20 hod. k signifikantním změnám v produkci ROS v porovnání s hepatocyty inkubovanými pouze s APAP v příslušné koncentraci (graf. 8). Viabilita izolovaných hepatocytů byla 88 %.

K signifikantnímu nárůstu tvorby ROS došlo u hepatocytů inkubovaných s APAP resp. LIRA a APAP v uvedených koncentracích vůči kontrole. Tento nárůst produkce ROS byl závislý na koncentraci APAP. Data vykazovala normální rozdělení.

Graf. 8: *Vliv LIRA o koncentraci 100 nmol/l na tvorbu ROS hepatocyty poškozené APAP o koncentracích 2,5; 3,75 a 5 mmol/l po 20 hod. inkubaci* (n = 6, * p < 0,05, *** p < 0,001, APAP+LIRA vs APAP, **** p < 0,0001, APAP+LIRA vs K)



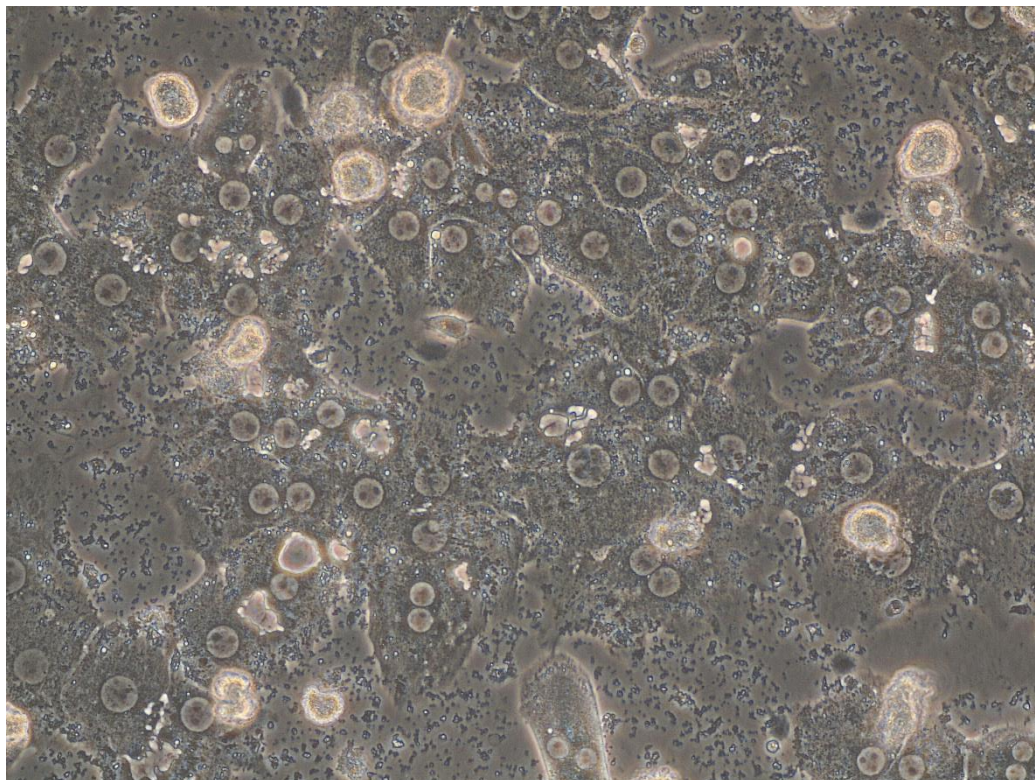
8.2 Výsledky morfologického hodnocení

Nepoškozené hepatocyty mají polygonální tvar, celistvou plazmatickou membránu a kulaté, světlé dobře ohraničené a znatelné jádro; poměrně často jde o buňky dvoujaderné (obr. 21). Steatotické hepatocyty se od předchozího popisu liší velkým množstvím tukových kapének v cytoplazmě, které často až překrývají jádro (obr. 22). Vzhled hepatocytů jsme hodnotili ve fázovém mikroskopu při zvětšení 200x.

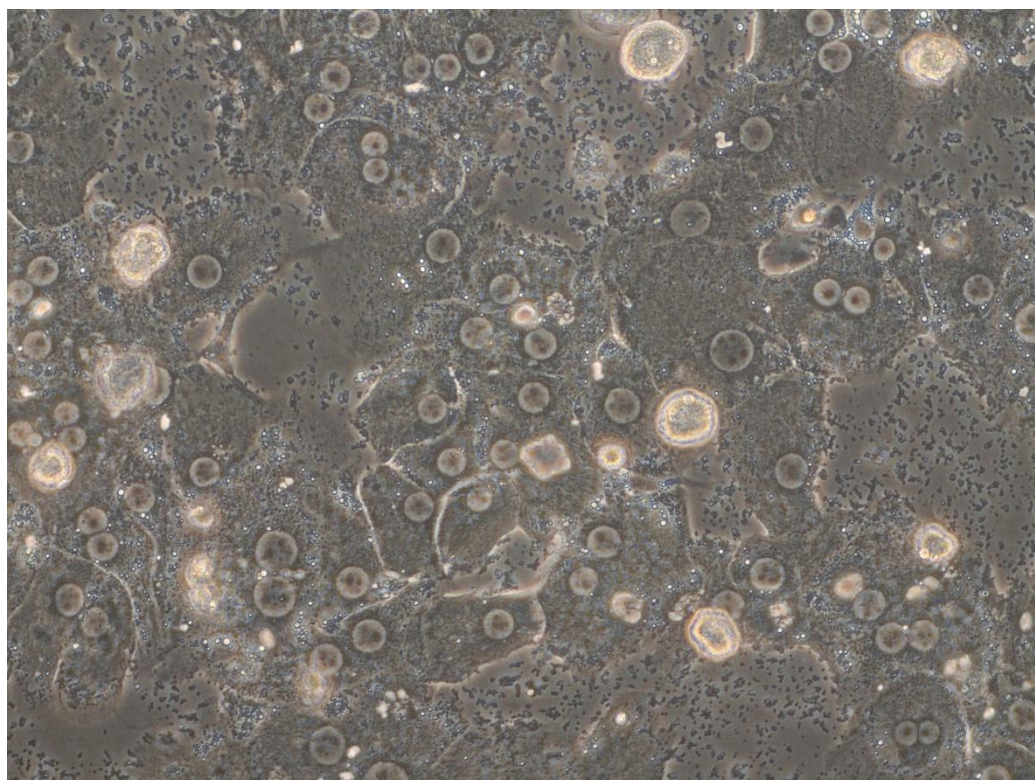
Vzhled nesteatotických (ST-1, obr. 21), ani steatotických (HF, obr. 23) hepatocytů po 24 hod. působení 100 nM LIRA (obr. 22 a 24) se nelišil od vzhledu hepatocytů kultivovaných s LIRA (obr. 21 a 23).

Dále jsme hodnotili morfologii hepatocytů po 20 hodinové inkubaci 100 nM LIRA s APAP o koncentracích 2,5; 3,75 a 5 mM. Viabilita izolovaných hepatocytů byla 88 %. Hepatocyty poškozené APAP mění své morfologické parametry; s přibývajícím koncentrací APAP roste i počet a intenzita morfologických znaků poškození. Při 2,5 mM APAP si buňky zachovávají původní vzhled, jádra jsou dobře znatelná a s nimi i několik jadérek; roste ovšem počet cytoplazmatických výběžků a stupeň granulace (obr. 25). Při 3,75 mM APAP jsou již jádra obtížně rozlišitelná, objevuje se výrazná granulace cytoplazmy. Některé z buněk ztrácejí kontinuitu cytoplazmatické membrány (obr. 26). U 5 mM APAP registrujeme vysoký stupeň granulace, jádra jsou jen těžce rozeznatelná, buňky jsou zakulacené, začínají se odlučovat od kolagenového povrchu a shlukovat se (obr. 27). Nezaznamenali jsme žádné morfologické změny u hepatocytů kokultivovaných s APAP a LIRA.

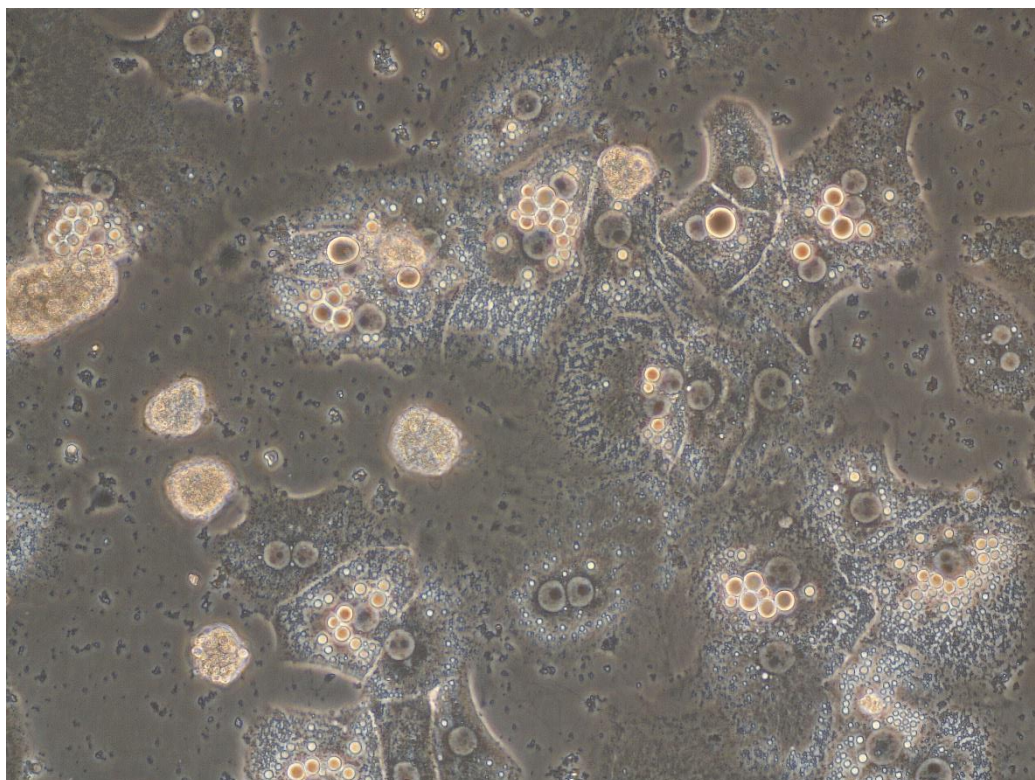
Obr. 21: *Mikrofotografie ST-1 hepatocytů v primokultuře po 24 hod. inkubaci (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



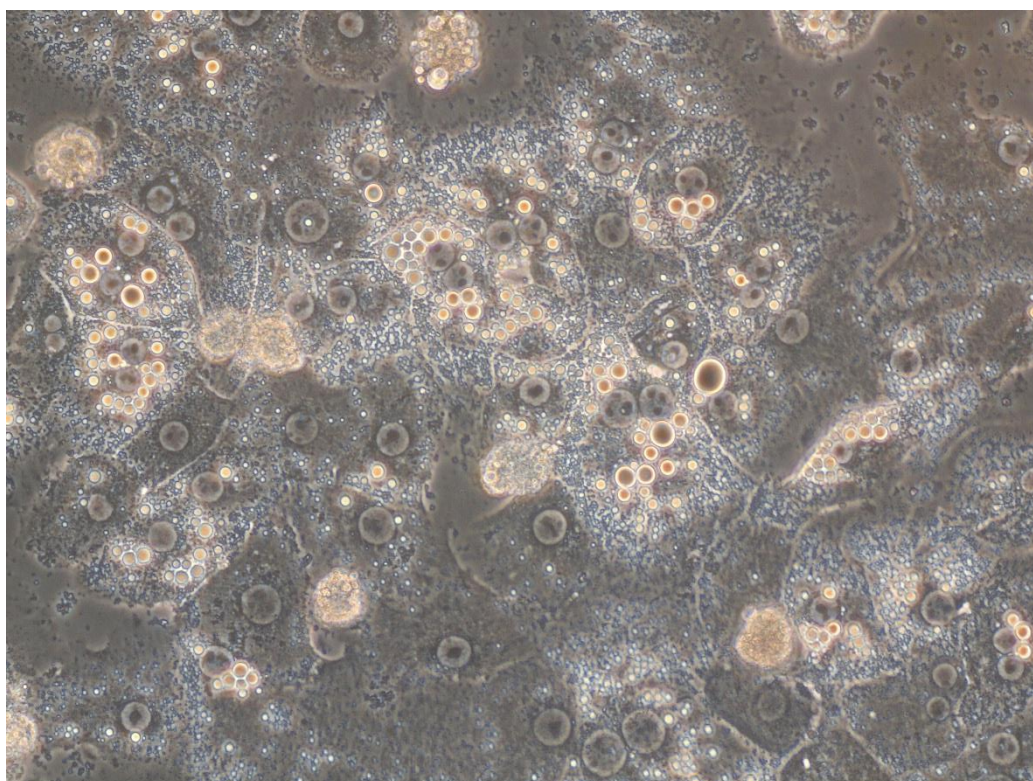
Obr. 22: *Mikrofotografie ST-1 hepatocytů v primokultuře po 24 hod. inkubaci se 100 nM LIRA (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



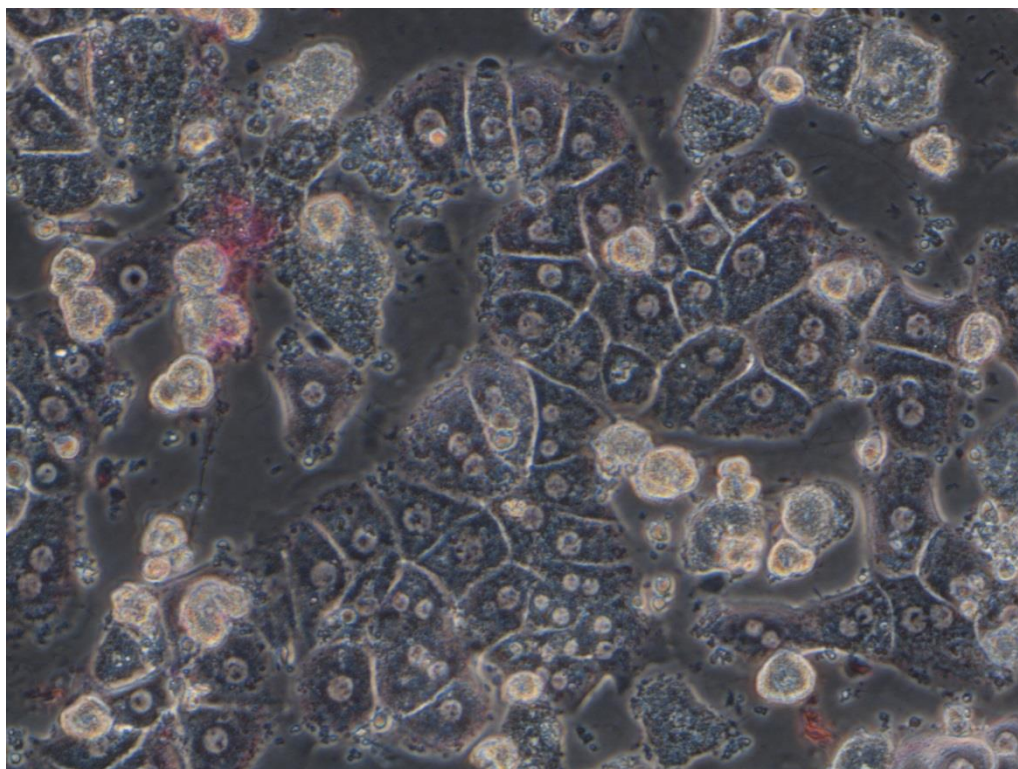
Obr. 23: *Mikrofotografie HF_K hepatocytů v primokultuře po 24 hod. inkubaci (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



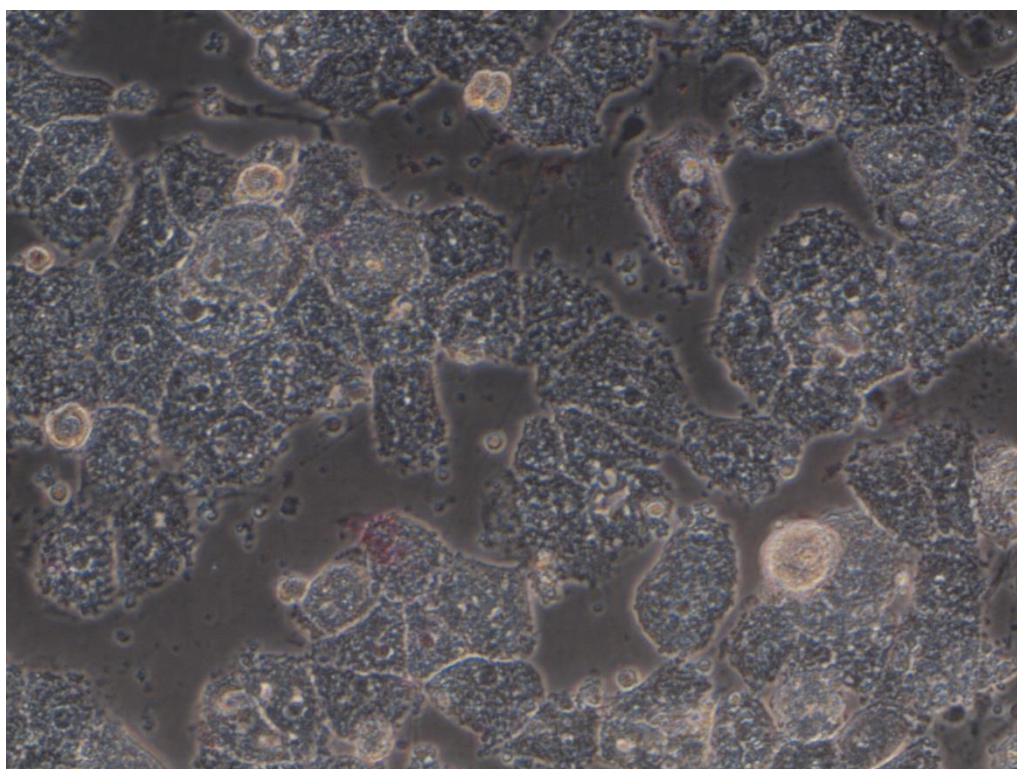
Obr. 24: *Mikrofotografie HF hepatocytů v primokultuře po 24 hod. inkubaci se 100 nM LIRA (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



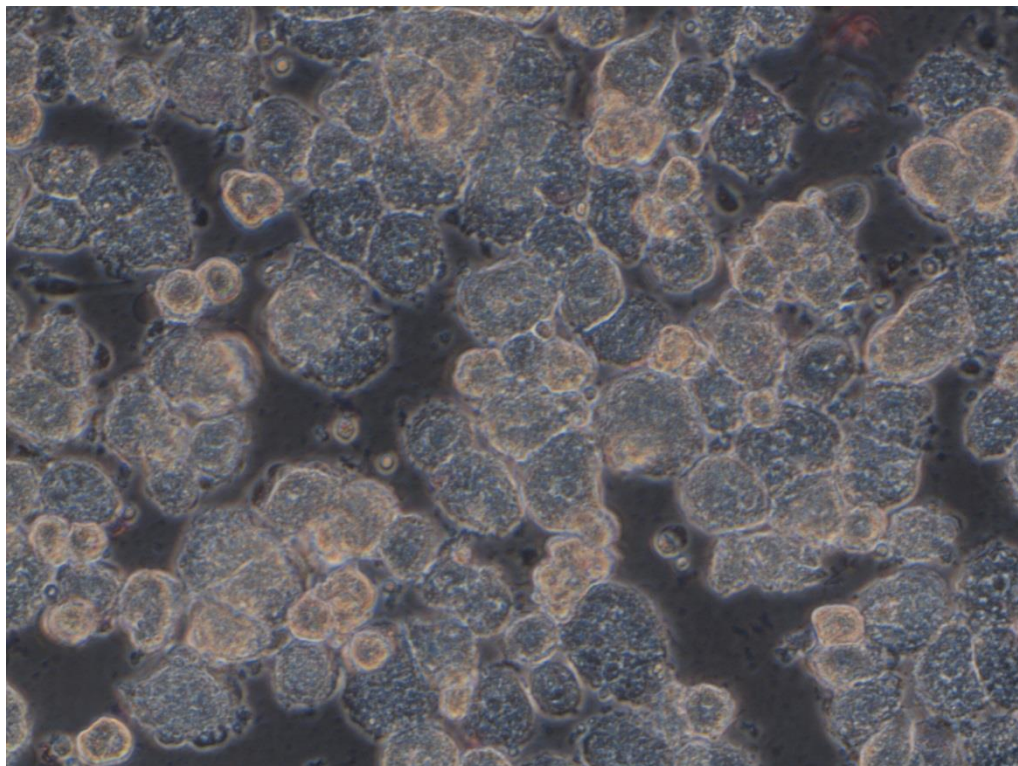
Obr. 25: *Mikrofotografie hepatocytů v primokultuře poškozených APAP 2,5mM po 24 hod. inkubaci (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



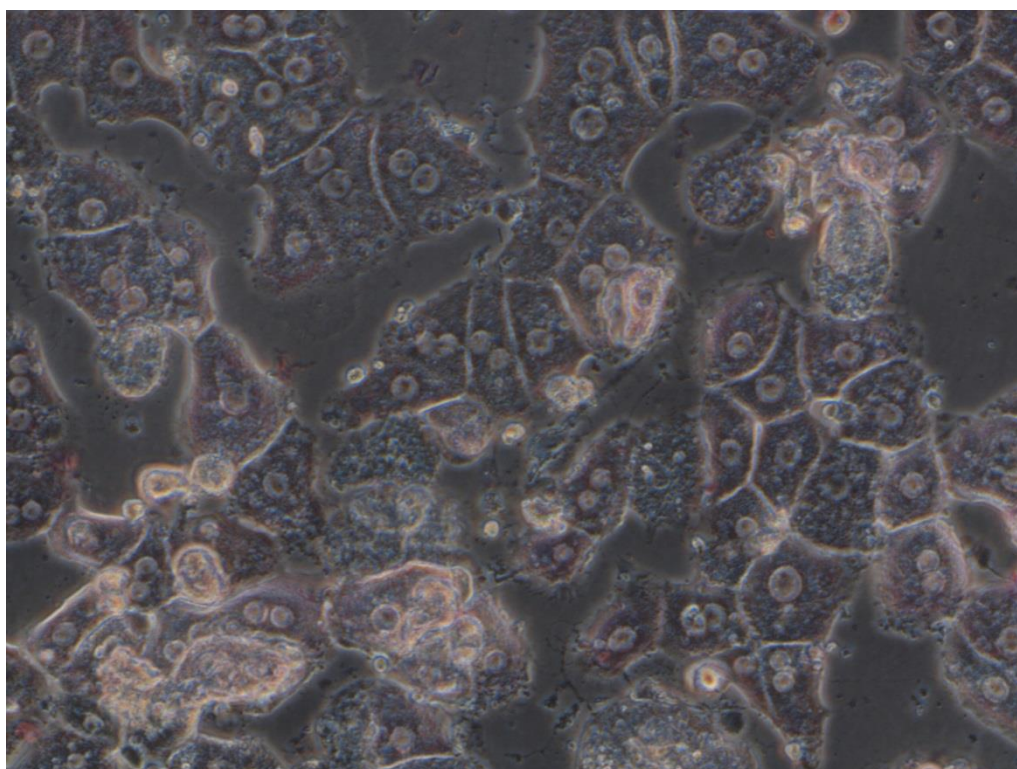
Obr. 26: *Mikrofotografie hepatocytů v primokultuře poškozených APAP 3,75 mM po 24 hod. inkubaci (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



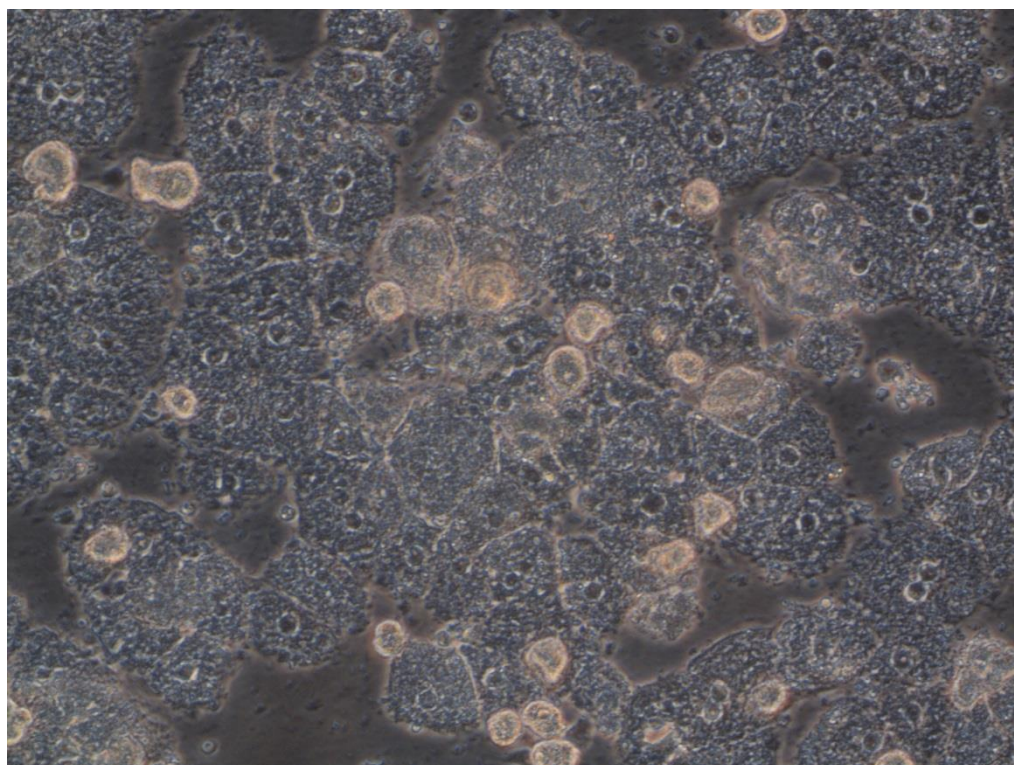
Obr. 27: *Mikrofotografie hepatocytů poškozených APAP 5 mM po 24 hod. inkubaci (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



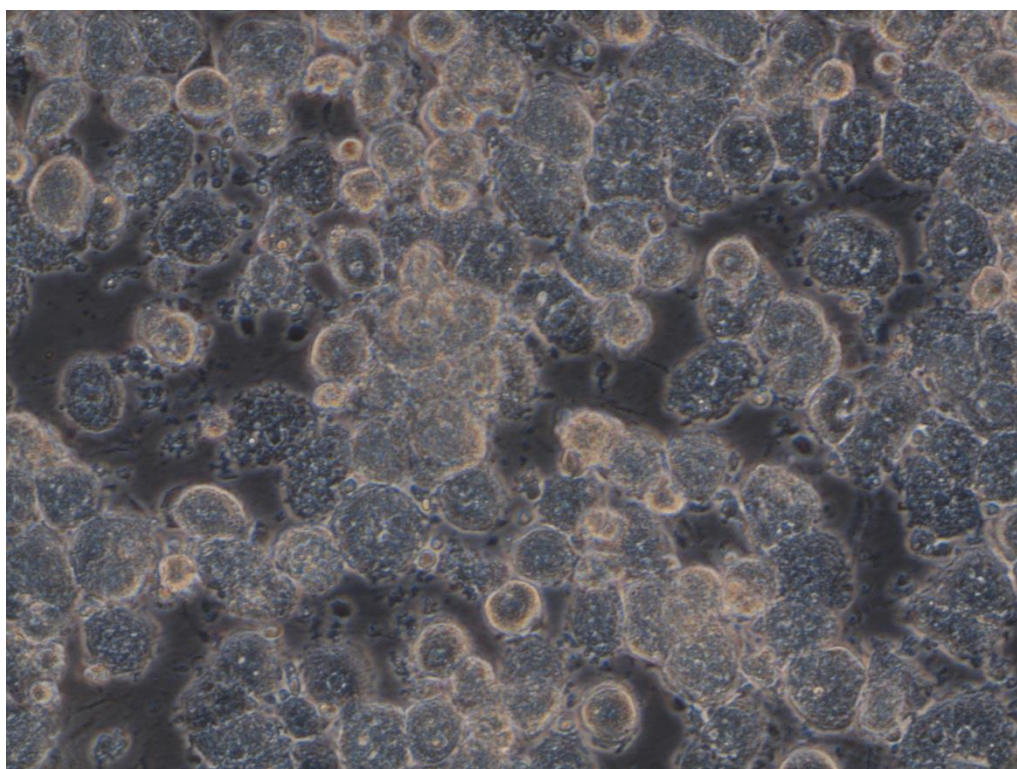
Obr. 28: *Mikrofotografie hepatocytů inkubovaných současně s 2,5 mM APAP a 100 nM LIRA po dobu 20 hod. (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



Obr. 29: *Mikrofotografie hepatocytů inkubovaných současně s 3,75 mM APAP a 100 nM LIRA po dobu 20 hod. (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



Obr. 30: *Mikrofotografie hepatocytů inkubovaných současně s 5 mM APAP a 100 nM LIRA po dobu 20 hod. (fázový kontrast, zvětšení 200x)*



9 DISKUZE

Liraglutid (LIRA) se řadí mezi inkretinová mimetika, analoga GLP-1 s dlouhým účinkem. Je indikován u pacientů s diabetem typu 2 (DM2) jako lék druhé volby pro dospělé, a to po nedostatečné úpravě glykémie předchozí monoterapií nebo kombinovanou léčbou. Podpůrným kritériem volby je BMI > 35 kg/m². [37] Analoga GLP-1 jsou látky, které vzhledem ke své podobné struktuře působí stejně jako endogenní inkretin GLP-1 uvolňovaný z tenkého střeva a zároveň jsou dostatečně odlišné na to, aby odolaly endogenním peptidázám DPP4 a NEP. K jejich dlouhodobému působení přispívá také forma, kdy po subkutánním podání tvoří heptamery, které se postupně uvolňují do krve, a velká vazebnost na albumin. [38] Díky těmto a dalším farmakokinetickým vlastnostem může být, na rozdíl od ostatních analog, aplikován pouze jednou denně [42].

LIRA nezpůsobuje prostřednictvím tzv. inkretinového efektu jen snížení koncentraci glukózy v krvi, ale také významně snižuje hmotnost a BMI, glykovaný hemoglobin a upravuje funkčnost jater [17]. Jeho vliv na glykémii a tělesnou hmotnost pacientů byl hodnocen v programu LEAD (*Liraglutide Effects and Action in Diabetes*), jehož cílem bylo porovnání těchto parametrů s dalšími antidiabetiky [39].

Stejně jako ostatní analoga GLP-1 působí prostřednictvím GLP-1 receptoru (GLP-1R), který je exprimován v buňkách pankreatu, srdci, mozku, ledvinách a v některých pasážích gastrointestinálního traktu. V pankreatu je navázáním GLP-1 na GLP-1R spuštěna signalizační kaskáda, jejímž prostřednictvím dojde k uvolňování inzulinu a amylinu v β -buňkách a somatostatinu v δ -buňkách pankreatu. [28] V α -buňkách pankreatu stejné signalizační dráhy stejnými mechanismy sníží sekreci glukagonu, a tím dojde k poklesu tvorby glukózy v játrech a jejího exportu do krve [40].

Cílem této práce bylo zjistit a popsat vliv LIRA co by analoga GLP-1 na primární kultury hepatocytů potkana, tedy v podmínkách *in vitro*, a to na intaktní steatotické (HF) a nesteatotické (ST-1) hepatocyty a na hepatocyty poškozené acetaminofenem (HF/ST-1+APAP). Primární kultury hepatocytů jsou v současnosti jedním z nejpoužívanějších *in vitro* modelů pro testování hepatotoxicity, hepatoprotektivity látek [50] či lékových interakcí [51]. Po zajištění adekvátních podmínek pro přežití použitím různých kultivačních médií, vhodným ošetřením inkubačních nádob, inkubací v termoboxu, uchovávání při 5% CO₂, vyvarování se

kontaminace; disponují primární kultury hepatocytů uspokojivě dlouhou životností. [50] Dalšími výhodami jsou např. dobrá manipulace se vzorky a možnost testování více koncentrací látek během jednoho pokusu. Jako u všech metod *in vitro* zůstává problém s extrapolací některých výsledků do podmínek *in vivo* a současná nejednotnost v metodikách v rámci různých výzkumných pracovišť (obtížné porovnávání), ať už jde o použití různých suplementů v kultivačních médiích, denzity nasazených buněk [50] nebo odlišností v typu zvířat co se týká podmínek chovu – hlavně stravy - ze kterých jsou jaterní buňky izolovány [55]

V našem experimentu byli použiti samci potkanů kmene Wistar: 1) potkani s dietně indukovanou steatózou jater, kteří byli krmení vysokotukovou stravou po dobu 6 týdnů a 2) potkani bez jaterní steatózy, krmení standardní stravou po stejnou dobu. Vysokotuková dieta podávaná po uvedené době vede k navození ztukovatění jater [18]. Potkani s indukovaným NAFLD jsou využívány jako modely jaterní steatózy, obezity a inzulinové rezistence. [53] Samotné NAFLD patří mezi nejčastější jaterní onemocnění tzv. civilizovaného světa a steatóza jater je jeho základním diagnostickým kritériem.

Steatotické hepatocyty obecně vykazují vyšší náchylnost k oxidačnímu stresu [19]. Jako hlavní příčina NAFLD se uvádí dysbalance v lipidovém metabolismu. [17] Steatóza je stav reverzibilní, klinicky často němý i v pokročilých stádiích; přesto mění některé parametry funkčnosti jater; objevují se různé stupně mitochondriální dysfunkce, zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), snížení obsahu glutathionu jako důležitého antioxidantu, cytokinová nerovnováha [19] a zvýšená aktivita Kupfferových buněk [47], což může být příčinou progresu prosté steatózy do stádia NASH. Přesný mechanismus však znám není. [19], stejně tak neexistuje specifická terapie těchto stavů [56]. Nedávné studie uvádění GLP-1 jako možnou terapii NAFLD. Terapeutické snahy by se obecně měly opírat o modulaci lipidového metabolismu a ovlivnění inzulinové signální dráhy v hepatocytu, což analoga GLP-1 splňují.

NAFLD je společně s dalšími patologickými a patofyziologickými stavy jako inzulinová rezistence, DM2 a hypertenze jsou součástí tzv. metabolického syndromu [57]; tyto velmi úzce spjaté odchylky jsou častou příčinou morbiditu a mortality ve vyspělých zemích [17]. GLP-1 analoga snižují inzulinovou rezistenci a podporují metabolismus glukózy. Několik klinických studií i studií na zvířatech prokázaly terapeutické účinky agonistů GLP-1R ve zpomalení vývoje NAFLD, některé i snížení zánětu. Studie uvádějí terapeutický vliv analog GLP-1 na NAFLD příznivým

ovlivněním signálních drah v hepatocytech. Je popisováno, že GLP-1 zvyšuje fosforylaci aktivované proteinkinázy v hepatocytu, tím stimuluje oxidaci mastných kyselin (a odvrací rozvoj jaterní cirhózy) [17], ke které obecně dochází u 3 % pacientů s NAFLD [23].

Zvýšení citlivosti β -buněk k inzulinu a zefektivnění lipidového metabolismu působí preventivně proti vzniku NAFLD, protože dojde ke snížení oxidačního stresu. Inzulinová rezistence jde též často ruku v ruce s obezitou, která je považována za jeden z nejrizikovějších faktorů vzniku NAFLD. [58] Je známo, že LIRA na rozdíl např. od vidagliptinu (inhibitoru DPP4) a pioglitazonu (sensitive inzulínu) významně snižuje tělesnou hmotnost [59 a) b) c)], a to jak přímo ovlivněním glukózového a lipidového metabolismu v játrech, nebo nepřímo přes regulaci vyprazdňování žaludku a ovlivnění centra sytosti v CNS [60].

Některé studie *in vivo* popisují, že analoga GLP-1 způsobí skrz GLP-1R v hepatocytech přímo snížení stupně jaterní steatózy a fibrózy [61]. Steatotické hepatocyty vykazují vyšší vulnerabilitu vůči hepatotoxickým látkám v porovnání s nesteatotickými [62]. S ohledem na acetaminofen byly popsány tyto účinky i *in vivo* [19] Možné mechanismy toxického působení APAP byly popsány v pracích [63 a) b) c)] Jedním z uvažovaných mechanismů je snížení koncentrace GSH v hepatocytech. Hepatocyty poškozené APAP se používají k testování hepatoprotektivních účinků látek.

Sledovali jsme účinky LIRA o koncentracích 1, 10 a 100 nmol/l po 24 hodinovém působení na intaktní steatotické a nesteatotické hepatocyty a očekávali jsme, že případná změna intenzity oxidačního stresu se odrazí ve změně měřených biochemických parametrů. Dále jsme hodnotili parametry poškozených hepatocytů acetaminofenem o koncentraci v rozsahu 2,5-5 mmol/l kokultivovaných s liraglutidem po dobu 20 hod. za účelem zjištění případných hepatoprotektivních účinků.

Součástí hodnocení kultur hepatocytů bylo pozorování morfologie buněk pod mikroskopem s fázovým kontrastem a kontrola viability a určení denzity buněk, protože ke správnému průběhu testů je nutná viabilita buněk vyšší jak 85% a známá hodnota hustoty buněk. Viabilita byla dále během pokusu sledována pomocí citlivého WST-1 testu a pomocí LDH, což je též citlivý marker buněčného membránového poškození.

Funkční kapacita hepatocytů byla měřena pomocí albuminu testem ELISA. Dále byla měřena koncentrace MDA, co by ukazatele peroxidace membránových lipidů, a koncentrace ROS, co by markeru oxidačního stresu, která byla hodnocena fluorimetricky DCFDA testem.

Steatotická játra vzhledem k vyššímu tukovému zatížení, snížení obsahu antioxidantů, snížení aktivit enzymů účastnících se metabolismu ROS, zvýšení prozánětlivých cytokinů a aktivací Kupfferových buněk a mitochondriálními dysfunkcemi obecně trpí vyšší hladinou oxidačního stresu [47]. Tomu odpovídají námi naměřené několikanásobně vyšší hladiny LDH u HF než ST-1 hepatocytů, nižší aktivita dehydrogenáz při WST-1 testu a vyšší míra membránového poškození buněk u steatotických hepatocytů oproti nesteatotickým; což je v souladu i s dalšími dostupnými pracemi [19]. Steatotické hepatocyty v našem pokusu vykazovaly signifikantně vyšší syntézu albuminu než nesteatotické, což je v rozporu s dosud popsányi údaji [19]; patrně to bylo způsobeno vyšší denzitou nasazených HF buněk v našich kulturách hepatocytů oproti standardu. Koncentrace MDA byly vyšší u HF; stejně tak fluorimetricky změřené koncentrace ROS pomocí testu DCFDA byly vyšší u HF hepatocytů než u ST-1. Steatotické hepatocyty tedy vykazovaly vyšší míru membránového a oxidačního poškození než buňky nesteatotické. S uvedeným koresponduje i zaznamenaná nižší míra metabolické aktivity u HF hepatocytů v porovnání s hepatocyty ST-1.

V rámci jednotlivých skupin jsme však v uvedených parametrech signifikantní změny v porovnání s kontrolami (ST-1_LIRA ku ST-1_K, HF_LIRA ku HF_K) nepozorovali. Uvedené koncentrace LIRA po 24 hodinové inkubaci neměly na měřené parametry (měření aktivity LDH v kultivačním médiu, resp. LDH leakage, WST-1 test, produkce albuminu, MDA a ROS) vliv ani u ST-1, ani u HF hepatocytů.

V případě hepatocytů poškozených APAP viabilita klesá se zvyšující se koncentrací APAP u hepatocytů inkubovaných s LIRA a APAP, i u hepatocytů inkubovaných jen s APAP. Co se týká tvorby ROS, byl zaznamenán signifikantní nárůst tvorby ROS u hepatocytů inkubovaných s APAP resp. LIRA a APAP vůči kontrole. Tento nárůst byl závislý na koncentraci APAP, což je v souladu s dostupnými pracemi [62, 63]. WST-1 test a test DCFDA u hepatocytů poškozených APAP jsme prováděli v rámci pilotní studie a protože nenaznačovaly signifikantní změny v měřených parametrech, nebylo měření znovu opakováno, ani nebyl experiment doplněn o další stanovení.

Z výsledků morfologického hodnocení buněk poškozených APAP též nevyplývá, že by 100 nM LIRA po 20 hodinovém působení primární kultury hepatocytů nějak ovlivňoval.

Z výsledků vyplývá, že uvedené koncentrace LIRA ST-1 ani HF hepatocyty nepoškozují, ani jejich již poškozené funkce nezlepšují.

Naše výsledky samozřejmě nemohou vyloučit účinek LIRA na potkaní hepatocyty.

Předpokládají se pleiotropní účinky LIRA nejen na játra samotná, ale i na ostatní druhy tkání. Zdá se, že analoga GLP-1 skrývají velký potenciál pro možnost využití v mnoha dalších experimentálních, potažmo klinických, oblastech. V posledních letech proběhly a probíhají zvyšující se počty studií, ať už klinických či na zvířatech, zabývající se účinky analog GLP-1, které postupně odkrývají široké spektrum možného využití. Ku příkladu bylo zjištěno, že analoga GLP-1 přechází přes hematoencefalickou bariéru a pozitivně ovlivňují neurogenezi v mozku [64], což by mohlo nabízet uplatnění na poli léčby neurodegenerativních onemocnění, např. Alzheimerovy choroby, pro kterou je mimo jiné DM2 jedním z rizikových faktorů [64, 65]. Objevily se první studie, které prokazují neuroprotektivní účinky LIRA na mozkové ischemie prostřednictvím ovlivnění VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) [66]. Hluběji je zkoumán i účinek na pankreas; některé studie naznačují, že analoga GLP-1 potencují proliferaci β -buněk. Tato skutečnost by byla dalším významným pozitivním „vedlejším“ účinkem této antidiabetické léčby. To samé lze říci o kardioprotektivních účincích. Na myších modelech bylo prokázáno, že GLP-1 analoga prostřednictvím aktivované proteinkinázy snižují adhezi monocytů na cévní stěnu a že celkově zlepšují srdeční funkce *in vivo* [67] a že mají příznivé účinky na endoteliální dysfunci; zvyšují syntézu eNOS (endoteliální syntázy oxidu dusnatého) a snižují expresi ICAM (intracelulárních adhezních molekul) v endotelu aorty [68].

Všechny objevené vlastnosti vyžadují další zkoumání, včetně těch jaterních.

10 ZÁVĚR

Z našich výsledků vyplývá, že LIRA v našem experimentálním uspořádání neovlivňuje u nesteatotických ani u ztukovatělých hepatocytů potkana v primární kultuře sledované parametry (měření aktivity LDH v kultivačním médiu, resp. LDH leakage, WST-1 test, produkce albuminu, MDA a ROS). LIRA též v našem experimentu nenavodil morfologické změny hepatocytů v primokultuře, ani nevykazoval v našem uspořádání hepatotoxický, či hepatoprotektivní vliv vůči toxicitě APAP v primárních kulturách hepatocytů potkana.

11 SEZNAM ZKRATEK

ACC	<i>acetyl-CoA carboxylase</i>
ACL	<i>ATP citrate lyase</i>
ALT	alaninaminotransferáza
APAP	acetaminofen
ApoB	apolipoprotein B
AST	aspartátaminotransferáza
ATF-4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATP	adenosintrifosfát
BMI	<i>body mass index</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CPT-1	<i>carnitine palmitoyl transferase-1</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
c-src	<i>cellular Src kinase</i>
DCFDA	2',7' –dichlorofluorescein diacetát
DM 2	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus typu 2
DMSO	dimethyl sulfoxid
DPP-4	dipeptidyl peptidáza-4
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i> , endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EPAC	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FBS	fetální bovinní sérum
FFA	<i>free fatty acid</i> , volné mastné kyseliny
Gadd-34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GIP	gastrický inhibiční polypeptid
GLP-1	<i>glucagon - like peptide1</i> , glukagonu podobný peptid 1
GLP1-R	<i>glucagon-like peptide receptor</i> , receptor pro glukagonu podobný peptid 1
GLP-2	<i>glucagon - like pepitde 2</i> , glukagonu podobný peptid 2
GLUT 2	glukózový transportér 2

GSH	glutathion, redukovaná forma
HbA1c	frakce glykovaného hemoglobinu A1c
HF	<i>high fat (diet, hepatocytes)</i> , vysokotukový
HSL	<i>hormone-sensitive lipase</i> , hormon-senzitivní lipáza
CHOP	<i>C/EBP homolog protein</i>
ChREBP	<i>carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> , intracelulární adhezní molekula
IGF	<i>insulin growth factor</i> , inzulinový růstový faktor
IR	<i>insulin resistance</i> , inzulinová rezistence
IRS-2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
LCE	<i>long-chain fatty acyl elongase</i>
LDH	laktátdehydrogenáza
LDH-EC	<i>extracellular lactat dehydrogenase</i>
LDH-L	<i>lactat dehydrogenase leakage</i>
LEAD	<i>Liraglutide Effects and Action in Diabetes</i>
LIRA	liraglutid
L-PK	<i>liver pyruvate kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDA	malondialdehyd
MK	mastné kyseliny
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , mediátorová RNA
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	nealkoholová steatohepatitida
NEP	neutrální endopeptidáza
NFκB	<i>nuclear factor κB</i> , jaderný faktor κB
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PDX-1	<i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PKC	proteinkináza C
PM	Petriho miska
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SAT	<i>subcutaneous adipose tissue</i> , podkožní tuková tkáň
SCD	<i>stearoyl-CoA desaturase</i>
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element binding protein-1c</i>

ST	<i>standard (diet, hepatocytes)</i>
TAG	triacylglyceroly
TBA	<i>thiobarbituric acid</i> , thiobarbiturová kyselina
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , trichloroctová kyselina
TG	<i>triglycerides</i>
TGF α	<i>transforming growth factor α</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TK	tlak krve
TMB	trimethyl boritan
VAT	<i>visceral adipose tissue</i> , viscerální tuková tkáň
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
vWF	Von Willebrandův faktor
WP	<i>well plate</i>
WST-1	4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonát

12 SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. ČIHÁK R., *Anatomie 2*, Praha 2002, ISBN 80-247-0143-X, str. 127-147
2. NETTER F. H., *Netterův anatomický atlas člověka*, Brno 2010, ISBN 978-80-251-2248-8, tabule 287
3. MARIEB, ELAINE N. and MALLATT, JON, *Anatomie lidského těla*, Brno 2005, ISBN 80-251-0066-9, str. 657 - 662
4. PAULSEN, DOUGLAS F., *Histologie a buněčná biologie*, Praha 2004 ISBN 80-7319-024-9, str. 244 – 248
5. MARTÍNEK, J. a VACEK, Z., *Histologický atlas*, Praha 2009, ISBN 80-247-2393-8, str. 41 – 42
6. MAZUROVÁ, Y., *GIT III: játra, žlučník, pankreas (exokrinní část)*, přednáška pro studenty Všeobecného lékařství ze dne 18. 2. 2014, dostupné z http://web.lfhk.cuni.cz/histologie/Histols_web/vyuka/vseobecne/histologie_II/pre-dnasky.asp (5. 5. 2014)
7. JANQUEIRA, CARLOS L., CARNEIRO, J., KELLEY, O., *Základy histologie*, Jinočany 1997, dotisk 1999, ISBN 80-85787-37-7, str. 303-318
8. KONRÁDOVÁ, UHLÍK, VAJNER, *Funkční histologie*, 2. vydání, Jinočany 2000, ISBN 80-86022-80-3, str. 179 - 185
9. SILBERNAGL, STEFAN, DESPOPOULOS, AGAMEMNON, *Atlas fyziologie člověka*, Praha 2004, ISBN 80-247-0630-X, str. 243-260, 269-285
10. KITTNAR, O. a kol., *Lékařská fyziologie*, Praha 2011, ISBN 978-80-247-3068-4, str. 372, 508
11. MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W.: *Harperova biochemie*, Jinočany, 2002., ISBN: 80-7319-013-3, str. 165-167, 190-198, 262-288
12. GANONG, W. F., *Přehled lékařské fyziologie*, Galén 2005, ISBN 80-7262-311-7, str. 339-361, 241-246
13. ČERVINKOVÁ Z., *Metabolismus a játra*, SANQUIS č.40/2005, str. 14, dostupné z <http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=art362> (5. 5. 2014)
14. SKÁLOVÁ L., BOUŠOVÁ I. a kolektiv., *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Praha 2011, ISBN 978-80-246-1917-0, str. 21-33
15. NEČAS E. et al., *Patologická fyziologie orgánových systémů*, část II, Praha 2009, ISBN 978-80-246-1710-7, str. 508 – 515

16. EHRMANN J., HŮLEK P. et al., *Hepatologie*, Praha 2010, ISBN: 8024770393, str. 331-332
17. LEE J., HONG S-W., RHEE E-J., LEE W-Y, *GLP-1 Receptor agonist and non-alcoholic fatty liver disease* (2012), *Diabetes & Metabolism Journal*, p. 263-267
18. KUČERA O., GARNOL T., LOTKOVÁ H., STAŇKOVÁ P., MAZUROVÁ Y., HROCH M., BOLEHOVSKÁ R., ROUŠAR T., ČERVINKOVÁ Z., *The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats* (2011), *Physiol. Res.* 60: p. 317-328
19. KUČERA O., AL-DURY S., LOTKOVÁ H., ROUŠAR T., RYCHTRMOC D., ČERVINKOVÁ Z., *Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen* (2012), *Physiol. Res.* 61: p. 93-101
20. WAGNER L. B.; RINELLAM. E., *The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis* (2011), *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2011, 4, p. 249–263.
21. HORÁK J., *Jaterní steatóza nevyvolaná alkoholem: diagnostika a léčba* (2014), *Medicína po promoci 1/2014*, dostupné z <http://www.tribune.cz/clanek/32279-jaterni-steatoza-nevyvolana-alkoholem-diagnostika-a-lecba> (5. 5. 2014)
22. TRUNEČKA P., *Nealkoholická steatohepatitida a možnosti její léčby* (2007), *Remedia 4/2007*, dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Gastroenterologie/Nealkoholicka-steatohepatitida-a-moznosti-jeji-lecby/8-12-ia.magarticle.aspx> (5. 5. 2014)
23. OHKI T., ISOGAWA A., IWAMOTO M., et al, *The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetesmellitus compared to sitagliptin and pioglitazone* (2012), *The ScientificWorld Journal*, Article ID 496453, p. 1-8
24. NELSON S. D., BRUSCHI S. A., *Mechanisms of acetaminophen-induced liver diseases* (2003), In: Kaplowitz N, DeLeve LD (Ed): *Drug induced liver disease*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 287-325
25. LOTKOVÁ H., KUČERA O., ROUŠAR T., ENDLICHER R., KŘIVÁKOVÁ P., GARNOL T., ČERVINKOVÁ Z., *Effect of S-adenosylmethionine on acetaminophen-induced toxic injury of rat hepatocytes in vitro* (2009), *ACTA VET. BRNO*, 78: p. 603-613

26. KUČERA O., LOTKOVÁ H., KŘIVÁKOVÁ P., ROUŠAR T., ČERVINKOVÁ Z., *Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro* (2006), *Československá fyziologie*, 55/2006 č. 3, str. 52-59
27. JABOR. A. et al., *Encyklopedie laboratorní medicíny*, dostupné z www.sekk.cz. (5. 5. 2014)
28. HALUZÍK M., SVAČINA Š., *Inkretinová léčba diabetu*, Praha 2010, ISBN 978-80-204-2247-7, str. 25-28
29. WOOK K., EGAN J., *The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment* (2008), *Pharmacological Reviews*, *Pharmacol Rev* 60:470–512
30. NAUCK, M. A. et al.: *Reducet incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes* (1986), *Diabetologia*; 29: p. 46 – 52
31. KVAPIL M., ANDĚL M., *Terapeutické využití inkretinů*, Doporučení ČDS z 1. 4. 2008, dostupné z: http://www.diab.cz/dokumenty/inkretiny_08.pdf (5. 5. 2014)
32. HOLST J. J., *The physiology of glucagon-like peptide 1* (2007), *Physiol Rev* 87: p. 1409–1439
33. HOLST J. J., GROMADA J., *Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans* (2004), *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: p. 199–206
34. GIGOUX V., FOURMY D., *Acting on hormone receptors with minimal side effect on cell proliferation: a timely challenge illustrated with GLP-1R and GPER* (2013), *Front. Endocrinol.*, 29
35. SEINO Y., YABE D., *Glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pankreas* (2013), *J Diabetes Investig.* Mar 18, 2013; 4(2): p. 108–130
36. CHLUP R., *Inkretiny, inhibitory DPP4 a inhibitory SGLT2* (2012), *Klin Farmakol Farm* 2012; 26(3): str. 139–142
37. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU, dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001026/WC500050017.pdf (5. 5. 2014)
38. PELIKÁNOVÁ T., *Liraglutid* (2011), *Remedia* 2011; 21: str. 290–296
39. DEACON C. F., *Potential of liraglutide in the treatment of patients with type 2 diabetes* (2009), *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5: p. 199–211

40. KVAPIL M., *Liraglutid - analog GLP-1*(2011), Postgraduální medicína 1/2011, str. 15-19, dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/liraglutid-analog-glp-1-457051> (5. 5. 2014)
41. RACEK J. et al, *Klinická biochemie*, Praha 2006, ISBN: 80-7262-324-9, str. 166
42. JURKOVÁ J., *Victosa (liraglutid)* (2011), Interní Med. 2011; 13(2): str. 93-96
43. ŽDÁNSKÁ-JANÍČKOVÁ J., *Liraglutid* (2009), Remedia 2009; 19: str. 116–120
44. RYBKA, KVAPIL, *Inkretinová léčba diabetu* (2011), Postgraduální medicína, dostupné z <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/inkretinova-lecba-diabetu-459232> (5. 5. 2014)
45. RAČICKÁ E., *Přínos liraglutidu v léčbě obézního diabetika 2. typu* (2012), Medical Tribune 23/2012, dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/28572-prinos-liraglutidu-v-lecbe-obezniho-diabetika-typu> (5. 5. 2014)
46. HALUZÍK M., *Průvodce léčbou diabetu 2. typu pro internisty*, Praha 2011, ISBN 978-80-204-2405-1, str. 80-83
47. MALAGUARNERA M, DI ROSA M, NICOLETTI F, MALAGUARNERA L: *Molecular mechanisms involved in NAFLD progression* (2009). J Mol Med 87: p. 679-695
48. a) BROWNING J. D., HORTON. J. D., *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury* (2004), J Clin Invest. 2004;114(2)
- b) LARTER C. Z., CHITTURI S., HEYDET D., FARRELL G. C., *A fresh look at NASH pathogenesis* (2010), Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 25, no. 4, p. 672–690
50. GUILLOUZO A., *Liver cell models in in vitro toxicology* (1998), Environ Health Perspect 106(Suppl 2): p. 511-532
51. ČERVINKOVÁ Z., LOTKOVÁ H., KUČERA O., *Možnosti využití izolovaných jaterních buněk v experimentální hepatologii* (2011), Abstrakta postgraduálního kurzu, XXXIX. májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 10–13. 5. 2011, Gastroent Hepatol 2011; 65
52. BERRY M. N., GRIVELL A. R., GRIVELL M. B., PHILLIPS J. W., *Isolated hepatocytes - past, present and future* (1997), Cell Biology and Toxicology. 1997; 13: p. 223-233
53. LIEBER CS, LEO MA, MAK KM, XU Y, CAO Q, REN C, PONOMARENKO A, DECARLI LM: *Model of nonalcoholic steatohepatitis* (2004), Am J Clin Nutr 79: p. 502-509

54. HELD P., *An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells* (2012), BioTek Instruments, dostupné z:
http://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS%20Application%20Guide.pdf
(8. 8. 2012)
55. KUČERA O., ČERVINKOVÁ Z., *Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats* (2014), *World J Gastroenterol* 2014 July 14; 20(26): p. 8364-8376
56. TRUNEČKA P., *Léčba NAFLD/NASH – režimová a dietní opatření, farmakoterapie a transplantace jater*, Abstrakta postgraduálního kurzu, XL. májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 16.–18. 5. 2012, *Gastroent Hepatol* 2012; 66
57. ANGELICO F., BEN D.M., CONTI R. et al, *Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease* (2005), *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 3, p. 1578–1582
58. MARCHESINI G., BRIZI M., BLANCHI G. et al, *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome* (2001), *Diabetes*, vol. 50, no. 8, pp. 1844–1850
59. a) LARSEN P. J., FLEDELIUS CH., KNUDSEN L. B et al, *Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats* (2001), *Diabetes* 50: p. 2530–2539
b) RAUN K. et al, *Liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 analog, reduces body weight and food intake in obese candy-fed rats, whereas a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, does not* (2007), *Diabetes* 56: p. 8–15
c) SUZUKI D., TOYODA M., KIMURA M. et al, *Effects of liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on body weight, body fat area and body fat-related markers in patients with type 2 diabetes mellitus* (2013), *Intern Med* 52: p. 1029-1034
60. TOMAS E., WOOD J.A., STANOJEVIC V., HABENER J. F., *GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide inhibits weight gain and attenuates diabetes and hepatic steatosis in diet-induced obese mice* (2011), *Regul Pept* 2011;169:43-8
61. GUPTA N., A., MELLS J., DUNHAM R. M. et al, *Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing*

- hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway* (2010), *Hepatology*, vol. 51, no. 5, p. 1584–1592
62. KUČERA O, ROUŠAR T, STAŇKOVÁ P, HAŇÁČKOVÁ L, LOTKOVÁ H, PODHOLA M, ČERVINKOVÁ Z, *Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen* (2012), *J Gastroenterol Hepatol* 27: p. 323-330
 63. a) ROUŠAR T, KUČERA O., KŘIVÁKOVÁ P., LOTKOVÁ H., KANDĚAR R., MUŽÁKOVÁ V., ČERVINKOVÁ Z., *Evaluation of oxidative status in acetaminophen-treated rat hepatocytes in culture* (2009), *Physiol. Res.* 58: p. 239-246
 b) ROUŠAR T., PAŘÍK P., KUČERA O., BARTOŠ M., ČERVINKOVÁ Z., *Glutathione reductase is inhibited by acetaminophen-glutathione conjugate in vitro* (2010), *Physiol. Res.* 59: p. 225-232
 c) ROUŠAR T., NÝDLTOVÁ E., ČESLA P., STAŇKOVÁ P., KUČERA O., PAŘÍK P., ČERVINKOVÁ Z., *Purified acetaminophen-glutathione conjugate is able to induce oxidative stress in rat liver mitochondria* (2012), *Physiol. Res.* 61 (Suppl. 2): p. 103-109
 64. HUNTER K., HOLSCHER CH., *Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis* (2012), *Neuroscience* 2012, 13:33
 65. McCLEAN P., PARTHASARATHY V., FAIVRE E., HOLSCHER CH., *The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease* (2011), *The Journal of Neuroscience*, April 27, 2011 • 31(17): p. 6587– 6594
 66. SATO, K., KAMEDA M., YASUHARA T., AGARI T. et al, *Neuroprotective effects of liraglutide for stroke model of rats* (2013), *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, p. 21513-21524
 67. HOSSEIN N-A M., SHIKATANI A. E., SCHUIKI I., et al, *A Glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity* (2013), *Circulation.* 2013;127: p. 74-85
 68. GASPARI T., LIU H., WELUNGODA I., HU Y. et al, *A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion mouse model -/- molecule expression in an ApoE* (2011), *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2011 8: p. 117

69. BUETTNER R., PARHOFER K. G., WOENCKHAUS M., WREDE C. E., KUNZ-SCHUGHART LA, SCHÖLMERICH J., BOLLHEIMER L. C., *Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types* (2006), J Mol Endocrinol 36: p. 485-501
70. ERICKSON S. K., *Nonalcoholic fatty liver disease* (2009), J Lipid Res 50: p. 412-416
71. BROWNING J. D., HORTON J. D., *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury* (2004), J Clin Invest. 2004;114(2): p. 147-152